

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen-Mathematischen
Gesamtfakultät der
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Vorgelegt von
Diplom-Biologe André Teigler
aus Speyer

Tag der mündlichen Prüfung:

Etherlipid-Defizienz:
Phänotypische Veränderungen
im Kleinhirn der Maus

Gutachter: Prof. Dr. Felix T. Wieland
Prof. Dr. Wilhelm W. Just

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg in der Zeit vom 1.12.2006 bis zum 1.12.2008 unter der Leitung von Prof. Dr. W. Just ausgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Fertigstellen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Felix T. Wieland für die freundliche Aufnahme in das Institut.

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Wilhelm. W. Just für die interessante Themenstellung und seine tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung des Projektes. Seine vorbildliche Hilfe und ständige Diskussionsbereitschaft halfen mir diese Arbeit erfolgreich zu beenden.

Mein Dank gilt auch den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Just, allen voran Dorothee und Susanne für ihre ständige fachliche Diskussionsbereitschaft und ihre technische Unterstützung. Auch danke ich Alexander, Boyan, Lukas und Uma für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die hilfreichen Ratschläge.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Prof. Karin Gorgas und Herrn Prof. Andreas Draguhn für die Bereitstellung der Arbeitsplätze für histologische Färbungen bzw. elektrophysiologische Messungen sowie ihrer fachliche Hilfe in diesen Themengebieten. Frau Prof. Gorgas verdient des Weiteren Dank für ihre hervorragenden elektromikroskopischen Bilder. Auch den Mitgliedern der jeweiligen Arbeitsgruppen möchte ich dank sagen. Insbesondere Ingrid und Dorde (AG Gorgas), Nadine, Martin und Angela (AG Draguhn).

Zuletzt und doch zuerst gilt der Dank natürlich all jenen Freunden, Verwandten und Bekannten, die mich während dieser Zeit unterstützt, aufgebaut und ertragen haben. Allen voran meinen Eltern und Hannah.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig unter Anleitung verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Plasmalogene.....	3
2.1.1	Struktur.....	3
2.1.2	Biosynthese	4
2.1.3	Funktion	4
2.1.4	Plasmalogendefizienz.....	6
2.2	Zentrales Nervensystem	7
2.2.1	Aufbau	7
2.2.2	Cerebellum	8
2.2.3	Myelin	11
2.3	Oxidativer Stress	16
2.3.1	Definition	16
2.3.2	Lipidperoxidation	17
2.3.3	Antioxidative Systeme	17
2.3.4	Plasmalogene und oxidativer Stress.....	21
2.4	Die Plasmalogen-defiziente Maus als Modell.....	21
2.5	Zielsetzung	22
3	Material.....	23
3.1	Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterial	23
3.2	Spezielle Chemikalien und Artikel	23

3.2.1	Chemikalien und Artikel	23
3.2.2	Zellkulturmedien und –lösungen.....	24
3.3	Häufig verwendete Puffer	24
3.4	Geräte	25
3.5	Antikörper	25
3.5.1	Primärantikörper.....	25
3.5.2	Sekundärantikörper	27
3.5.3	Blockantikörper	27
3.6	Molekulargewichtstandards	28
3.6.1	Vorgefärbter Standard (Prestained).....	28
3.6.2	1 kb-DNA-Standard	28
3.6.3	100 bp-DNA-Standard	28
3.7	Versuchtiere und Haltung.....	29
4	Methoden	30
4.1	Biochemische Methoden	30
4.1.1	Proteinbestimmung nach Lowry	30
4.1.2	Probenvorbereitung für SDS-Page.....	31
4.1.3	SDS-Page	31
4.1.4	Nachweis von Proteinen in SDS-Gelen	33
4.1.5	Western-Blot	36
4.1.6	Oxidativer Stress	38
4.2	Zellbiologische Methoden.....	44
4.2.1	Fibroblasten in der Zellkultur.....	44
4.2.2	Medien.....	45
4.3	Molekularbiologische Methoden.....	46

4.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	46
4.3.2	Gelelektrophorese von PCR-Produkten	47
4.3.3	RNA-Isolierung für Microarray-Analyse.....	48
4.4	Histologische Methoden.....	49
4.4.1	Fixierung des Gewebes	50
4.4.2	Free Floating Immunhistochemie.....	50
4.4.3	Verwendung zweier monoklonaler Mausantikörper	52
4.4.4	Semidünnschnitte und Elektronenmikroskopie	54
4.4.5	Immunhistochemie für Semi- und Ultradünnschnitte	54
4.4.6	In vivo Kalziumfärbung	55
4.4.7	Filipinfärbung.....	56
5	Ergebnisse.....	57
5.1	Defekte in der Entwicklung des ZNS.....	57
5.1.1	Foliationsmuster und Körnerzellenmigration.....	57
5.1.2	Myelinisierung	59
5.1.3	Änderungen im paranodalen Bereichs	63
5.1.4	Innervierung der Purkinjezelle	67
5.1.5	Axonale Schwellungen im Kleinhirn	70
5.1.6	Cholesterin im Kleinhirn.....	75
5.1.7	Expressionsunterschiede im Kleinhirn.....	76
5.1.8	Zusammenfassung.....	78
5.2	Etherlipide und oxidativer Stress	79
5.2.1	Antioxidativer Organstatus	79
5.2.2	künstlicher oxidativer Stress	81
5.2.3	Zusammenfassung.....	84

6	Diskussion	86
6.1	Etherlipiddefizienz im ZNS	86
6.1.1	Foliationsmuster und Körnerzellenmigration.....	86
6.1.2	Lipide und Lipid-verankerte Proteine bei der Myelinbiogenese.....	87
6.1.3	Purkinjezellinnervierung	91
6.1.4	Axonale Schwellungen.....	92
6.1.5	Unfolded Protein Response.....	93
6.1.6	Andere Mausmodelle	97
6.1.7	Zusammenfassung.....	100
6.2	EL und oxidativer Stress	102
6.2.1	Oxidativer Organstatus.....	102
6.2.2	Lipidperoxidation im zentralen Nervensystem	103
6.2.3	Lipidperoxidation in Lipidextrakten	104
6.2.4	Fibroblasten.....	105
6.3	Ausblick	105
7	Verwendete Abkürzungen	107
8	Literaturverzeichnis	110

1 Zusammenfassung

Etherlipide bzw. Plasmalogene sind bei Säugetieren Bestandteile der Zellmembran. Die höchsten Konzentrationen findet man im Myelin des zentralen Nervensystems. In dieser Arbeit wurde ein Etherlipid-defizientes Mausmodell benutzt, um die Auswirkungen dieses Defizient auf das zentrale Nervensystem zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene histologische als auch molekularbiologische, biochemische und zellbiologische Methoden etabliert und angewendet. Besonders im Kleinhirn, aber auch im Kortex und im Sehnerv zeigten sich vielfältige Veränderungen.

Die Dismyelinisierung, die schon in meiner Diplomarbeit im Kortex festgestellt wurde, war auch im Kleinhirn zu sehen. Neben einer Störung des Foliationsmuster des Kleinhirns wurden auch Schwellungen in den Axonen der Purkinjezellen beobachtet. Elektronenmikroskopische Aufnahmen und Kolokalisationsstudien zeigten große Ansammlung von IP3R1-positiven Membranen, die oftmals in der direkten Umgebung des Ranvierschen Schnürrings zu finden waren. Ebenso verändert war die Innervierung der Purkinjezellen. Der Bereich der Kletterfaserinnervierung war reduziert zugunsten vermehrter Parallelfaserinnervierung. Ein weiterer Phänotyp, der sowohl im Kortex, Sehnerv und Kleinhirn zu finden war, ist eine Verlängerung des Caspr-positiven paranodalen Bereiches, wobei die Verteilung der Natrium- und Kaliumionenkanäle nicht verändert war. Eine Genexpressionsanalyse des Kleinhirns zeigte eine Abregulierung *der unfolded protein response*.

Nähere Untersuchungen des Mausmodells unter dem Aspekt des oxidativen Stresses ließen nur wenige Veränderungen außerhalb des zentralen Nervensystems erkennen. Obwohl das gesamte antioxidative Potential nicht verändert war, zeigte sich im zentralen Nervensystem dennoch eine deutliche Reduktion der oxidativen Abbauprodukte von mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Auch unter künstlichem oxidativen Stress war keine erhöhte Oxidation von Etherlipid-defizienten Proben zu beobachten. Dennoch zeigten sich Etherlipid-defiziente Fibroblasten anfälliger gegenüber induziertem oxidativen Stress.

Ob und inwiefern die beobachteten Phänotypen zusammenhängen, bleibt zu klären.

Summary

Etherlipids and plasmalogens respectively are vital parts of the mammalian cell membrane. The highest concentration can be measured in the central nervous system myelin. A etherlipid-deficient mouse model was used in this work to elucidate the impact of Etherlipid-deficiency on the central nervous system. Several kinds of histological, molecular biological, biochemical and cell biological methods were deployed to achieve this goal. Differences could be observed especially in the cerebellum but also in the central cortex and in the optic nerve.

The demyelination which was already seen in the cortex during my diploma thesis could also be seen in the cerebellum. Other observed phenotypes were a disturbance of the cerebellar foliation pattern and axonal swelling of the Purkinje cells. Electro-microscopical pictures and colocalization studies showed an unusual aggregation of IP3R1-positive membranes which were very often located next to the node of Ranvier. The Purkinje cell innervation was also changed. The area of climbing fiber innervation was reduced in favour of parallel fiber innervation. A general phenotype which was observed in the cerebellum, cortex and optical nerve was an elongation of the Caspr-positive paranodal region. Remarkably the distribution of sodium and potassium channels was not changed. A gene expression analysis of the cerebellum showed a reduced level of proteins connected to the unfolded protein response.

Further investigations of the antioxidative status of our mouse model showed little differences outside of the central nervous system. Although the total antioxidative potential was not altered a remarkable reduction of poly unsaturated lipid peroxidation products was measured. Also artificial oxidative stress induced no significant difference in oxidation between wild type and etherlipid-deficient animals. Nevertheless Etherlipid-deficient fibroblast showed a higher sensitivity towards induced oxidative stress.

If these observed phenotypes are interconnected still needs to be revealed.

2 Einleitung

2.1 Plasmalogene

2.1.1 Struktur

Etherlipide (EL) gehören zu der Klasse der Glycerolipide, besitzen aber gegenüber normalen Phosphoglyceriden an der sn-1-Position anstelle einer Ester- eine Etherbindung. Die sn-2-Position ist wie bei den übrigen Glycerinphosphatiden mit einer langkettigen häufig auch ungesättigten Fettsäure besetzt. Die dritte Hydroxylgruppe des Glycerins trägt eine Phosphatgruppe, die mit einem Alkohol verestert ist, meist Cholin oder Ethanolamin.

Plasmalogene (PL) gehören zu der Gruppe der EL, wobei in der Alkylkette am C1-Atom eine cis-ständige Doppelbindung (Vinyletherbindung) vorliegt (**Abb. 1.1**).

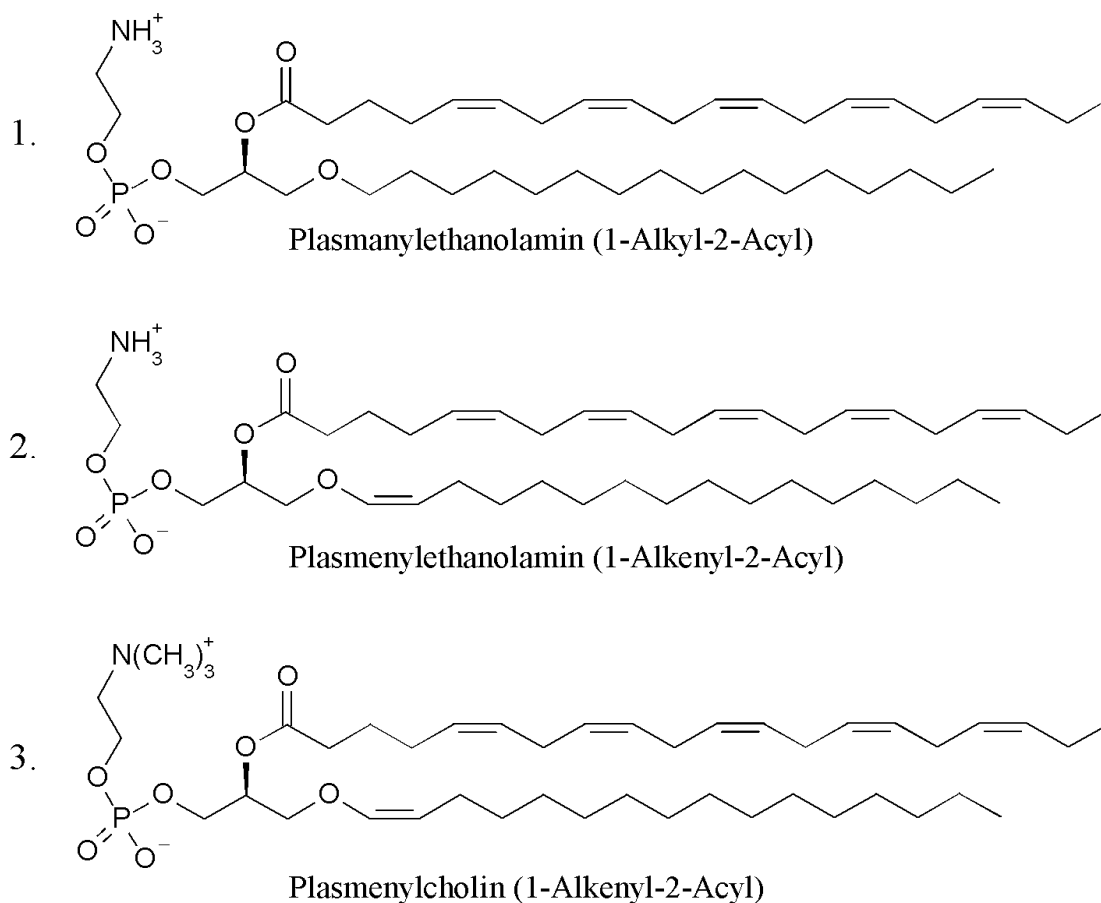


Abb. 1.1: Beispiele für Etherlipid (1) und Plasmalogene (2, 3)

Entdeckt wurde die Lipidklasse der PL von Feulgen et al. (1924). Die charakteristische Vinyletherbindung wurde später von Debuch et al. (1958) und Rapport et al. (1957) aufgeklärt, während Marinetti et al. (1959) die sn-1-Positionierung der cis-ständigen Doppelbindung beschrieb.

2.1.2 Biosynthese

Die ersten beiden Schritte der PL-Biosynthese finden in Peroxisomen statt. Die Ausgangssubstrate sind Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und eine langkettige Acyl-CoenzymA-Verbindung, die im ersten Schritt vom peroxisomalen Enzym DHAP-acyltransferase (DHAPAT) zu 1-Acyl-dihydroxyacetonphosphat umgewandelt werden. Das Produkt wird im zweiten Syntheseschritt vom Enzym Alkyl-DHAP-Synthase (ADHAPS) zu Alkyl-DHAP umgewandelt, indem die langkettige Fettsäure gegen einen langkettigen Alkohol ausgetauscht wird und so die Etherbindung entsteht (Hajra et al., 1995). Der nächste Schritt, bei dem die Ketogruppe der sn-2-Position reduziert wird, kann sowohl an der peroxisomalen Membran (**Abb. 1.2**) als auch im endoplasmatischen Retikulum (ER) stattfinden (van den Bosch et al., 1993). Alle nachfolgenden Schritte – der Transfer einer Acylgruppe auf die sn-2-Position und die Synthese der hydrophilen Kopfgruppe – finden ausschließlich im ER statt.

2.1.3 Funktion

Insgesamt sind 18% der Phospholipide des Menschen PL. Der Gehalt an PL variiert jedoch stark je nach Gewebe (Diagne et al 1984). Die höchsten Konzentrationen finden sich dabei im Herz, in der quergestreiften Muskulatur und im zentralen Nervensystem (Brites et al. 2004). In Säugerzellen spielen EL mit gesättigtem Alkylrest im Vergleich zu PL eine untergeordnete Rolle. Deshalb werden im weiteren Verlauf vor allem die Funktionen der PL näher beschrieben.

Als Lipide sind PL struktureller Bestandteil der Zellmembran und haben vermutlich darüber hinaus viele weitere Funktionen. So bilden Modellmembranen aus Ethanolaminplasmalogenen (PE-PL, Plasmenylethanolamine) anders als Membranen aus

Phosphatidylethanolaminen schon bei physiologischen Temperaturen nicht-lamellare Strukturen, die als Hex-II-Phasen bezeichnet werden (Paltauf et al. 1994). Dies erhöht die Durchlässigkeit der Membran für Ionen, und Fusionsvorgänge werden erleichtert (Lohner et al. 1996). So konnten auch Glaser et al. (1994) zeigen, dass Phospholipidvesikel mit einem hohen PE-PL-Gehalt schneller mit anderen Membranen fusionieren als Vesikel ohne PL. Darüber hinaus wurde in Membranbereichen, in denen vermehrt Fusionsvorgänge stattfinden, eine erhöhte PL-Konzentration gemessen (Gremo et al. 1985). Bei einer Erhöhung der PL-Konzentration im Sarkolemm steigt auch gleichzeitig die Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (Lee et al. 1998).

Es liegen in der Literatur vermehrt Hinweise vor, dass PL auch als Schutz der Membran vor oxidativem Schaden durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS, radical oxygen species) dienen. So konnte an PL-defizienten chinese hamster ovary (CHO-) Zellen bzw. humanen Fibroblasten eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress nachgewiesen werden (Hoeﬂer et al. 1991, Zoeller et al. 1988). Da die Vinyletherbindung oxidationsanfälliger als eine Esterbindung ist, könnten PL als Radikalfänger dienen (Nagan et al. 2001, Zoeller et al. 1999).

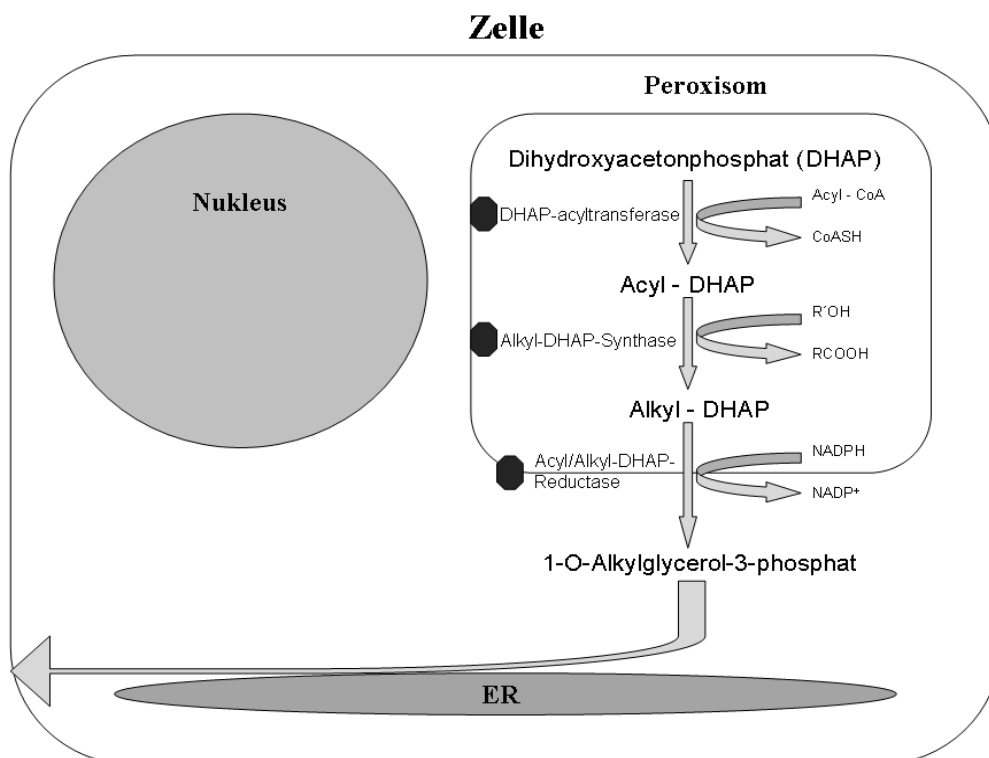


Abb. 1.2: Plasmalogensynthese

Der Zusammenhang zwischen PL und oxidativem Schaden wird im gesonderten Kapitel 1.3 weiter behandelt.

Die sn-2-Position von PL ist oft mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA, poly unsaturated fatty acids) besetzt, darunter auch wichtige Signalmoleküle wie Arachidonsäure. PL dienen somit als Speicher für diese Moleküle und können sie nach Stimulation freisetzen. In diesem Zusammenhang wurde in PL-defizienten Patienten aber festgestellt, dass die Gesamtkonzentration an Arachidonsäure unverändert ist, obwohl der Gesamtgehalt der Docosahexaensäure (22:6n-3, DHA), einer weiteren wichtigen PUFA, in allen Geweben verringert ist (Martinez et al. 1992). Glatte Muskelzellen von Kaninchen sezernieren Arachidonsäure, wenn sie mit Angiotensin II stimuliert werden, wobei ein großer Teil aus Plasmenylethanolamin freigesetzt wird (Ford et al. 1989). Die Abspaltung erfolgt durch eine Phospholipase A₂ (PLA₂). In der Literatur werden mehrere PL-spezifische PLA₂ beschrieben (Portilla et al. 1996, Wolf et al. 1985, Yang et al. 1996), so dass PL auf diesem Weg an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt sind. Ebenso gibt es Hinweise auf selektive Lipasen, die Alkenylacylglycerin aus PL freisetzen (Nagan et al. 2001, Dougherty et al. 1989). Ähnlich wie durch aus Phospholipiden freigesetztes Diacylglycerin können somit spezifische Proteinkinasen C aktiviert werden (Ford et al. 1989), die ihrerseits einen Signaltransduktionsweg einleiten.

2.1.4 Plasmalogendefizienz

Plasmalogendefizienz kann generell zwei Ursachen haben, Defekte der Peroxisomenbiogenese, wodurch mehrere Prozesse beeinträchtigt sind, zum anderen Defekte einzelner peroxisomaler Enzyme, die an der EL-Synthese beteiligt sind.

Zum ersten Typ zählen Krankheiten wie das Zellweger-Syndrom, rhizomele Chondrodysplasia punctata (RCDP) Typ 1, neonatale Adrenoleukodystrophie und infantiles Refsum-Syndrom. Zum zweiten Typ gehören Krankheiten wie RCDP Typ 2. Bei diesen Erkrankungen fehlen PL meist ganz, oder die PL-Synthese ist eingeschränkt. Die vielfältigen „phänotypischen“ Auswirkungen, die daraus resultieren, sind Neigung zu Hypotonie, Missbildungen des Skeletts und der Genitalien, sowie Nierenzysten und Leberzirrhosen.

Zusätzlich leiden alle Patienten mit PL-Defizienz unter neuronaler Dysfunktion. Es bleibt zu klären, welches dieser Symptome primär auf das Fehlen von PL zurückzuführen ist.

Neben den genannten peroxisomalen Erkrankungen gibt es noch weitere, in denen PL eine Rolle spielen. Im Gehirn von Alzheimer-Patienten liegt schon in frühen Krankheitsstadien ein niedriger Gehalt an PL vor (Ginsberg et al. 1995, Han et al. 2005). Ein Grund hierfür könnte die Aktivierung einer PL-spezifischen PLA₂ in entsprechenden Gehirnregionen sein (Farooqui et al. 1997), wobei die freigesetzten Stoffwechselprodukte, wie z.B. Arachidonsäure, zur Zellschädigung beitragen können. Gestützt wird diese Annahme durch Beobachtungen an Alzheimer-Patienten von oxidativen Schäden an Proteinen, Lipiden und DNA. Auch bei Krankheiten wie dem Down-Syndrom und Multipler Sklerose zeigen sich Verminderungen im PL-Gehalt (Farooqui et al. 2001).

2.2 Zentrales Nervensystem

2.2.1 Aufbau

Das zentrale Nervensystem von Vertebraten gliedert sich in Gehirn und Rückenmark. Das Gehirn wiederum teilt sich in:

- Prosencephalon (Vorderhirn), das sich aus Telencephalon (Endhirn) und Diencephalon (Zwischenhirn) zusammensetzt.
- Mesencephalon (Mittelhirn)
- Rhombencephalon (Rautenhirn), das sich aus Metencephalon (Hinterhirn) und Myelencephalon (Nachhirn, auch Medula oblongata genannt) zusammensetzt.

Nur ca. 10% der Zellen im Gehirn sind Neuronen, die restlichen 90% sind verschiedene Arten von Gliazellen. Darunter fallen Astrozyten, die vor allem eine strukturelle Funktion im zentralen Nervensystem haben, Oligodendrozyten, die die Myelinscheide der Nerven bilden (siehe 1.2.3) und Mikrogliazellen, die die Immunabwehr im Gehirn bilden.

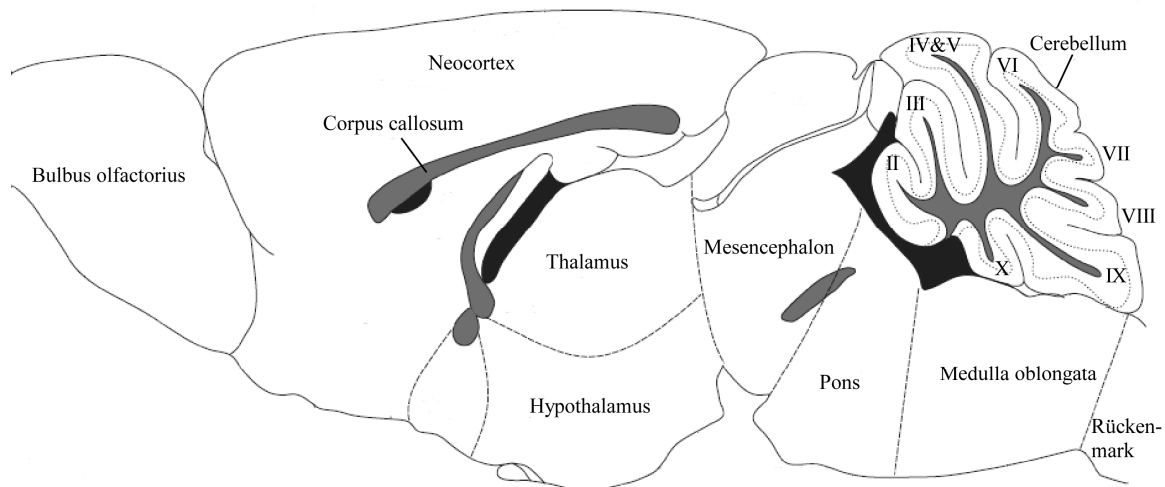


Abb. 1.3: Übersicht des Gehirns mit römischer Nummerierung der cerebellaren Folia (modifiziert nach Paxinos, The Mouse Brain Atlas)

2.2.2 Cerebellum

Das Kleinhirn (Cerebellum) gehört zusammen mit dem Pons zum Metencephalon. Es macht ca. 10-15% des gesamten Gehirngewichts aus (14,2% bei Ratten, 10,5% bei Menschen; Inukai, 1928). Tierexperimente von Flourens (1824) zeigten, dass eine Verletzung des Cerebellums weder die Planung noch die Ausführung einer Bewegung verhindern, aber deren Koordination bzw. Feinabstimmung stark eingeschränkt sind. In Studien mit Patienten, die eine Erkrankung des Kleinhirns hatten, konnte außerdem bewiesen werden, dass ihre Orthometrie stark eingeschränkt ist. Orthometrie ist die Fähigkeit, die Position eines Ziels, auf das eine Bewegung hin ausgeführt wird, in Raum und Zeit richtig vorherzusagen.

Als dritte Fähigkeit beobachtete Flourens bei seinen Experimenten, dass eine Teilresektion des Kleinhirns zu Gleichgewichtsstörungen führte, die aber nach einigen Tagen vom Tier kompensiert werden konnte. Luciani (1891) demonstrierte, dass eine weitere Verletzung des benachbarten Gebietes um die erste Verletzung herum diese Kompensation wieder aufhob. Dies zeigte, dass benachbarte Gebiete die Funktion von zerstörten Teilen des Kleinhirns übernehmen können und somit auch noch nach Abschluss der Entwicklung im adulten Stadium eine hohe synaptische Plastizität vorhanden ist.

2.2.2.1 Struktur

Wie in Abb. 1.3 zu sehen ist, gliedert sich das Cerebellum in einzelne Äste, den Folien, die die minimale Einheit des Kleinhirns darstellen. Die Folien sind grob aufgeteilt in äußeren Kortex, in dem die Informationsverarbeitung stattfindet und das myelinisierte Mark (auf dem Bild grau hinterlegt).

2.2.2.2 Zellulärer Aufbau

Das Kleinhirn gliedert sich in vier Schichten (**Abb. 1.4**):

- Molekularschicht (Kortex)
- Purkinjezellschicht (Kortex)
- Körnerschicht (Kortex)
- Medulläre Schicht (Mark)

In der Molekularschicht befinden sich die GABAergen (γ -Aminobuttersäure) inhibitorischen Stern- und Korbzellen. Zwischen Molekular- und Körnerschicht befinden sich die Purkinjezellen, die als einzige Zellen Signale aus dem Kleinhirn heraus senden. Sie stellen die zentrale Integrationseinheit des Kleinhirns dar. Die Körnerschicht enthält inhibitorische Golgizellen und vor allem exzitatorische Körnerzellen. Die medulläre Schicht enthält keine Neuronen, sondern die gesammelten Axone der Purkinjezellen.

Die Verschaltung des Kleinhirns ist trotz der verschiedenen beschriebenen Neuronentypen relativ einfach. Der Dendritenbaum der Purkinjezellen wird sowohl von den Parallelfasern der Körnerzellen als auch von den aus der Olive kommenden Kletterfasern innerviert. Die Körnerzellen bekommen ihre sensorischen und motorischen Informationen von den Moosfasern, deren Zellkörper hauptsächlich im Rückenmark, Pons und Hirnstamm liegen. Eine Parallelfaser bildet ca. 10^5 Synapsen zu Purkinjezelldendriten aus, aber nur ein bis zwei zu einer bestimmten Purkinjezelle, die somit nur schwach von einer einzelnen Parallelfaser innerviert wird. Im Gegensatz dazu bilden sich hunderte Synapsen zwischen einer bestimmten Purkinjezelle und einer Kletterfaser, und daraus folgt eine sehr starke Depolarisierung der Purkinjezelle durch die Kletterfaser (Watanabe et al. 2008).

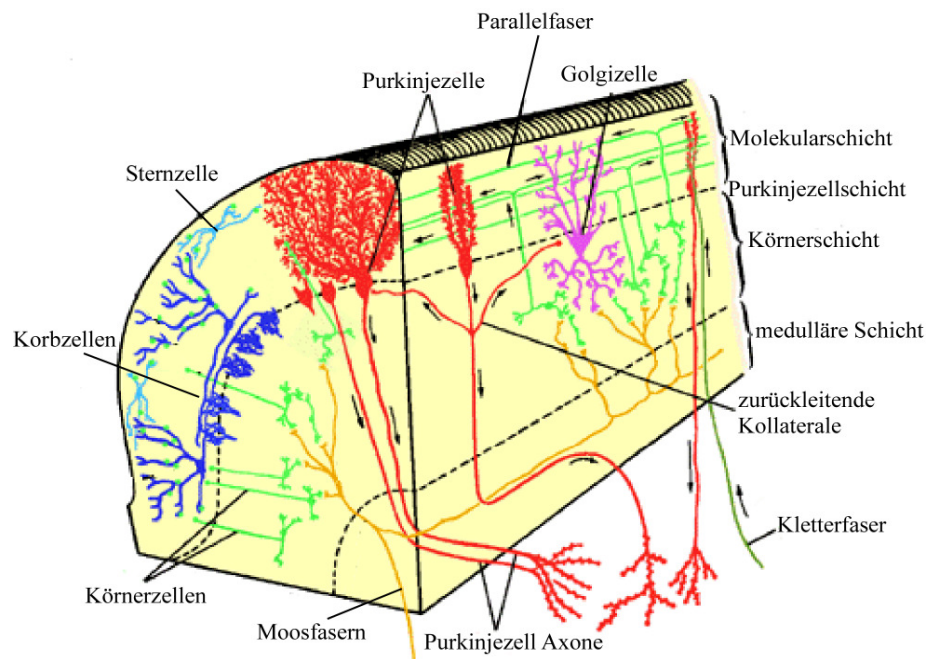


Abb. 1.4: Aufbau Kleinhirn (de Schutter 1998)

2.2.2.3 Entwicklung

Das Kleinhirn bildet sich aus denjenigen Vesikeln des Neuralrohrs, die zum Mes- und Metencephalon gehören (Alvarez Otero et al. 1989). Während der Entwicklung bilden sich zwei Zentren der Zellproliferation, die ventrikuläre Zone im Metencephalon und die externe Körnerschicht, die oberhalb der Molekularschicht liegt. In der ventrikulären Zone entstehen die Purkinjezellen, aber auch die Golgi-, Korb- und Sternzellen, während in der externen Körnerschicht die Körnerzellen gebildet werden. Diese wandern nach ihrer finalen Mitose von der externen Körnerschicht durch die Molekular- und Purkinjezellschicht in die (innere) Körnerschicht (ten Donkelaar et al. 2003) (**siehe Abb. 1.4**).

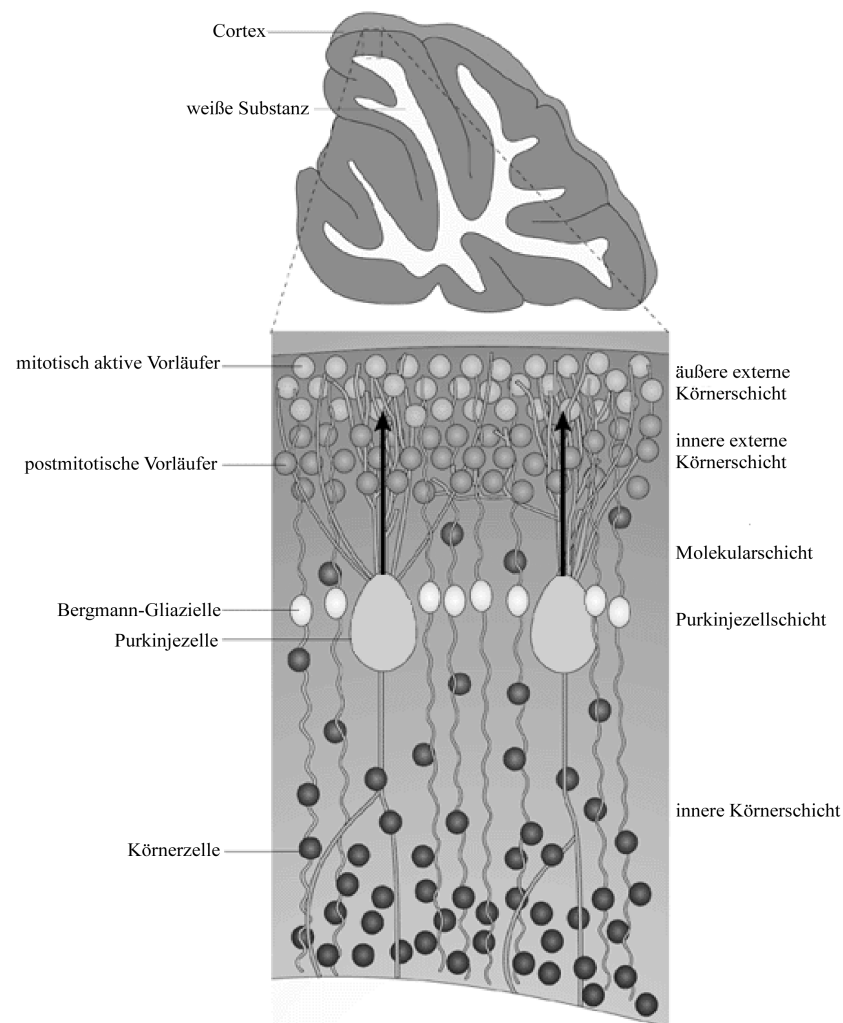


Abb. 1.5: Zellwanderung im entstehenden Cerebellum. Postmitotische Vorläuferzellen der Körnerzellen wandern von der externen Körnerschicht zur internen Körnerschicht, während der Dendritenbaum der Purkinjezellen in die entgegengesetzte Richtung wandert (Pfeil) (nach Ruiz i Altaba et al. 2002).

2.2.3 Myelin

2.2.3.1 Allgemein

Myelin bildet im Nervensystem von Vertebraten eine lipidreiche Hülle um die Axone der Neuronen. Gebildet wird die Myelinscheide von den Zellmembranen der Oligodendrozyten im zentralen Nervensystem (ZNS) oder Schwannschen Zellen im peripheren Nervensystem (PNS). Obwohl sich das Myelin des ZNS von dem des PNS im Aufbau unterscheidet, ist beiden Systemen jedoch gemeinsam, dass sich die Zellmembran der Gliazellen

(Oligodendrozyten bzw. Schwannsche Zellen) in einem fein abgestimmten Muster mehrmals um das Axon wickelt (**Abb. 1.6**).

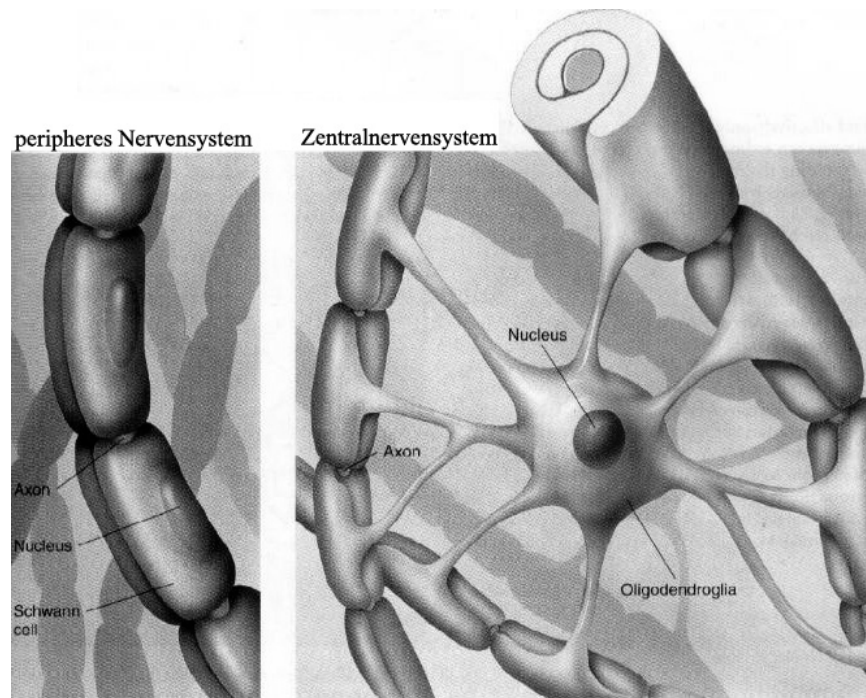


Abb. 1.6: Unterschiedliche Arten der Myelinisierung im peripheren und zentralen Nervensystem (nach Pollak E. I.)

2.2.3.2 Aufbau

Der grundsätzliche Aufbau des Myelins ist in ZNS und PNS gleich. Entdeckt wurde Myelin von Rudolf Virchow (1854), die heute gebräuchliche Terminologie geht auf Louis-Antoine Ranvier zurück (1878). Myelin wird aufgeteilt in die Myelinscheide (Internode) und den so genannten Ranvierschen Schnürring, an dem die Axonmembran nicht von der Myelinscheide umhüllt wird. Die Grenze zwischen Myelinscheide und Schnürring wird als Paranode und die angrenzende Region als Juxtaparanode bezeichnet (**Abb. 1.7**).

aus Axon und Myelinscheide ist im PNS von einer Basalmembran umgeben, die im ZNS komplett fehlt (zusammengefasst in Arroyo et al. 2000 und Sherman et al. 2005).

2.2.3.3 Lipide

Die Membran der Myelinscheide hat einen sehr hohen Lipidanteil von 77% (die meisten Zellmembranen haben einen Anteil von 50%). Der Plasmalogenanteil unter den Phosphoglyceriden ist mit 29% ungewöhnlich hoch, und auch Sphingolipide, insbesondere Cerebroside und Sulfatide, kommen mit 29% vermehrt vor (**Abb. 1.8**).

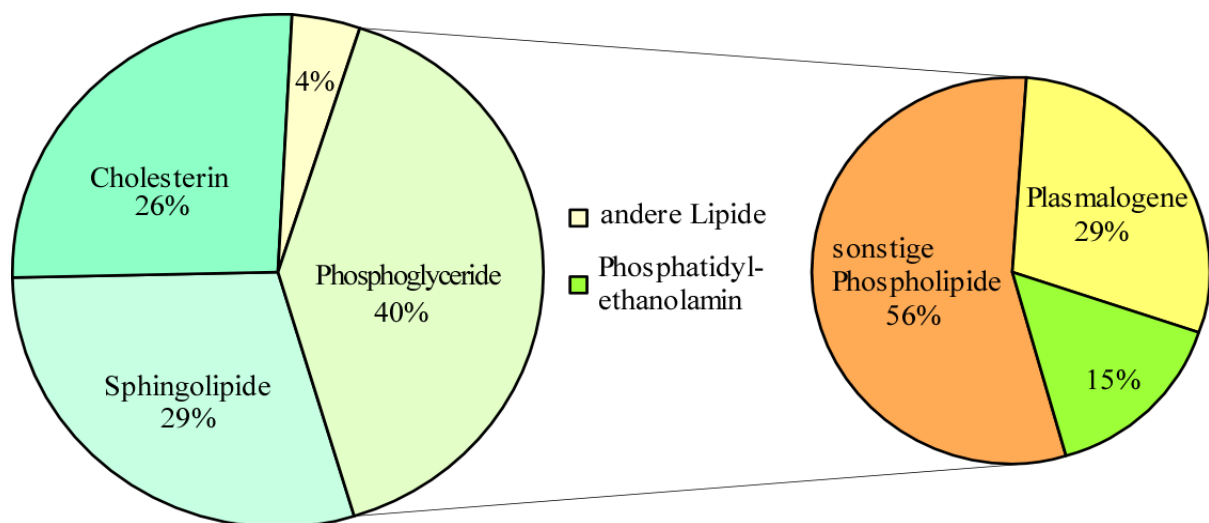


Abb. 1.8: Anteil der einzelnen Lipidklassen am Gesamtlipidgehalt und Aufschlüsselung der Phosphoglyceride in einzelne Lipide (Fewster et al. 1975).

2.2.3.4 Biogenese

Die Biogenese der Myelinscheide ist ein komplexer Prozess, der die Synthese von Lipiden wie z.B. Cholesterin und Proteinen wie *proteolipid protein* (PLP) und *myelin basic protein* (MBP), den zwei Hauptproteinen des kompakten Myelins, einschließt. Zudem muss der intrazelluläre Transport gewährleistet und die Strukturierung der Membran in die verschiedenen Abschnitte der Myelinscheide und den Rest der Membran aufrechterhalten werden. Die Lokalisation von MBP erfolgt, indem nicht das Protein, sondern zunächst die *Messenger-Ribonukleinsäure* (mRNS) entlang von Mikrotubuli zu den sich bildenden Myelinlamellen transportiert und vor Ort translatiert wird. PLP, Ganglioside und Sulfatide

werden hingegen über den klassischen exocytotischen Vesikeltransport entlang von Mikrotubuli zur Plasmamembran gebracht. Die einzelnen Schritte des vesikulären Transports, die die Proteine zur Myelinmembran bringen, sind im Detail noch weitestgehend unbekannt (zusammengefasst in Larocca et al. 2002).

2.2.3.5 Funktion

Die Myelinisierung der Axone hat mehrere Funktionen. Der Spannungsabfall über die Axonmembran wird im Bereich des kompakten Myelins stark reduziert und ermöglicht so die saltatorische Reizweiterleitung, bei der die elektrische Erregung (Aktionspotential) von einem Ranvierschen Schnürring, an dem sie durch die hohe Konzentration an Na^+ -Kanälen verstärkt wird, zum nächsten „springt“. Im internodalen Bereich wird der Strom nur passiv geleitet (Frankenhaeuser et al. 1951) (**Abb. 1.9**).

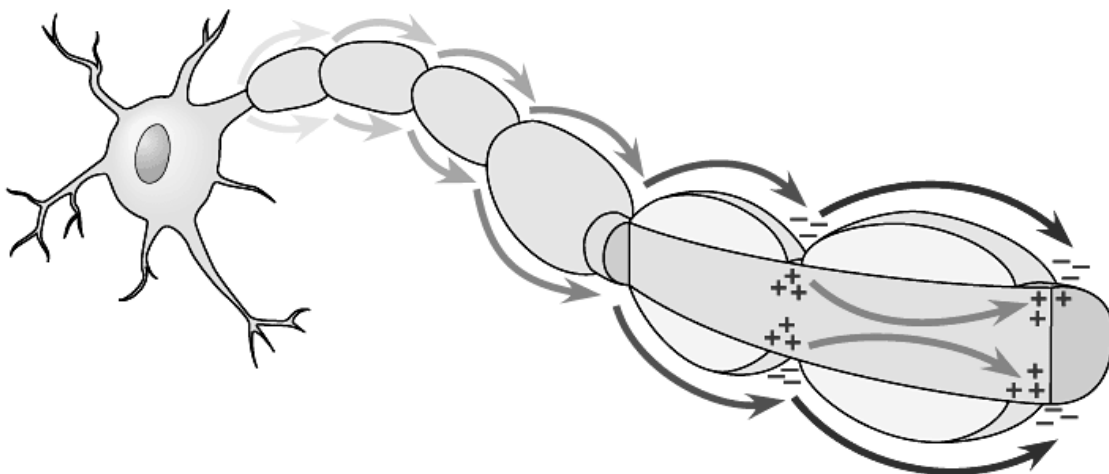


Abb. 1.9: Prinzip der saltatorischen Reizweiterleitung

Dieser Mechanismus beschleunigt die Leitungsgeschwindigkeit von mehreren Dezimetern pro Sekunde auf bis zu über hundert Meter pro Sekunde. Faktoren, die Einfluss auf die Leitungsgeschwindigkeit nehmen, sind einerseits der Axondurchmesser und der damit verbundene niedrigere elektrische Widerstand (Yagi et al. 1997) und andererseits der Abstand zwischen den einzelnen Ranvierschen Schnürringen (Court et al. 2004) bzw. die Dichte der Na^+ -Kanäle (Sangrey et al. 2004).

Für die Aufrechterhaltung der Ordnung und Funktion im ZNS ist die richtige Verknüpfung der Neurone wichtig. Einen Teil dazu trägt das Myelin bei, indem es als negativer Regulator für Axonverzweigungen (*sprouting*) dient (Schwab et al. 1996).

2.3 Oxidativer Stress

2.3.1 Definition

Oxidativer Stress wird häufig definiert als ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien (Jones, 2006). Dieser Zustand tritt in zwei Fällen ein:

Erstens durch eine zu hohe Menge an Radikalen bzw. reaktiven oxidativen Substanzen oder zweitens durch eine Abnahme der Menge an antioxidativen Substanzen. Die häufigste endogene Quelle für oxidativen Stress in Säugetieren ist der zur Atmung notwendige Sauerstoff (**Tab. 1.1**). Aber auch freie Metallionen wie Fe^{2+} oder Cu^+ können in Verbindung mit anderen Substanzen wie Ascorbat oxidierend wirken.

Radikalische Sauerstoffspezies	Nicht-radikalische Sauerstoffspezies
Superoxidanion-Radikal $\text{O}_2^{\cdot-}$	Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$
Perhydroxyl-Radikal HOO^{\cdot}	Wasserstoffperoxid H_2O_2
Hydroxyl-Radikal HO^{\cdot}	Hydroperoxid ROOH
Alkoxy-Radikal RO^{\cdot}	Ozon O_3
Peroxy-Radikal ROO^{\cdot}	

Tab. 1.1: Radikalische und nicht-radikalische Sauerstoffspezies

Exogene Quellen für oxidativen Stress sind u.a. Rauchen, UV-Strahlung, Luftverschmutzung. Folgen von oxidativem Stress sind DNA-Schäden, Autooxidation von Proteinen und Peroxidation von Lipiden.

2.3.2 Lipidperoxidation

Die Oxidation von Lipiden (Lipidperoxidation) verläuft als radikalische Kettenreaktion mit drei Phasen: Initiation, Kettenverlängerung und Termination. Die Initiation erfolgt durch reaktive Spezies, die ein Wasserstoffatom von einer Methylgruppe abziehen können. Hydroxylradikale können dies bei allen Fettsäuren, während Superoxidanionen nur mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren reagieren können. Die dabei entstehenden Alkyl- und Peroxylradikale reagieren mit umgebenden Fettsäuren und verlängern so die Kettenreaktion. Der Kettenabbruch erfolgt durch Reaktion zweier Radikale miteinander oder durch Reaktion mit Molekülen wie Vitamin E, die als Radikal stabil sind (Kelly et al., 1998).

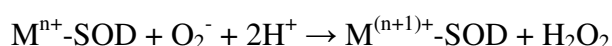
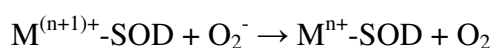
Während der unkontrollierten Kettenreaktion und der dabei auftretenden Fragmentierung der Lipide entstehen verschiedenste Moleküle, z.B. Alkane, Furane oder Ketone (Belitz et al., 1992). Einige der entstehenden Stoffe können zytotoxische oder mutagene Wirkung haben (Marnett, 1999).

2.3.3 Antioxidative Systeme

Antioxidative Systeme gliedern sich in zwei Gruppen. Auf der einen Seite gibt es die Enzym-basierten Systeme mit Superoxiddismutase, Katalase und das Glutathionsystem, auf der anderen Seite die nicht Enzym-basierenden Substanzen wie Vitamin C, E, Ubichinon und Harnstoff.

2.3.3.1 Superoxiddismutase

Das Enzym Superoxiddismutase (SOD) katalysiert die Dismutation von zwei Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff und wurde erstmal 1969 beschrieben (McCord et al.)

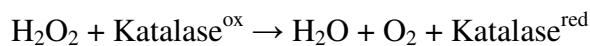
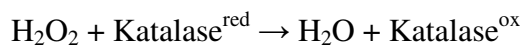


M steht für das jeweilige Metallkation, das zwischen zwei Oxidationszuständen oszilliert. Die Metalle sind Kupfer (n=1), Mangan (n=2), Eisen (n=2) und Nickel (n=2). Das bei der

Reaktion aus den zwei Superoxidanion-Radialen entstehende Wasserstoffperoxid muss von anderen antioxidativen Systemen, vor allem Katalase und Glutathion, entsorgt werden. Es gibt drei Isoformen der SOD: CuZnSOD im Cytosol, MnSOD in den Mitochondrien und extrazelluläre SOD (Warner et al., 2004).

2.3.3.2 Katalase

Das Enzym Katalase findet sich im Cytosol, aber vor allem auch in Peroxisomen. Die katalysierte Reaktion ist eine Disproportionierung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff in folgender Reaktion:



Katalase entgiftet Wasserstoffperoxid, das bei der Reaktion der SOD anfällt und bei Reaktionen wie peroxisomalen β -Oxidation (Chance et al., 1979).

2.3.3.3 Glutathionsystem

Glutathion (GSH) ist ein Tripeptid aus Glutamat, Cystein und Glycin. Der erste Schritt der Synthese wird von γ -Glutamylcysteinsynthetase katalysiert, indem eine ungewöhnliche Peptidbindung (Isopeptidbindung) zwischen der γ -Carbonylgruppe des Glutamats und der Aminogruppe des Cysteins gebildet wird. Im zweiten, vom Enzym GSH-Synthetase katalysierten Schritt wird Glycin an den C-Terminus des Dipeptids angefügt. Beide Schritte benötigen ATP. Die reaktive Sulfhydrylgruppe des Cysteinrestes kann mit einem weiteren Glutathion unter Abgabe von H_2 zur oxidierten Form (GSSG) reagieren.

Verschiedene Glutathionperoxidasen katalysieren diese Reaktionen und verwenden das Reduktionspotential, um organische Peroxide zu reduzieren. Oxidiertes Glutathion wird unter Verwendung von NADPH durch Glutathion Reduktase wieder zu GSH reduziert (Dringen et al., 2003).

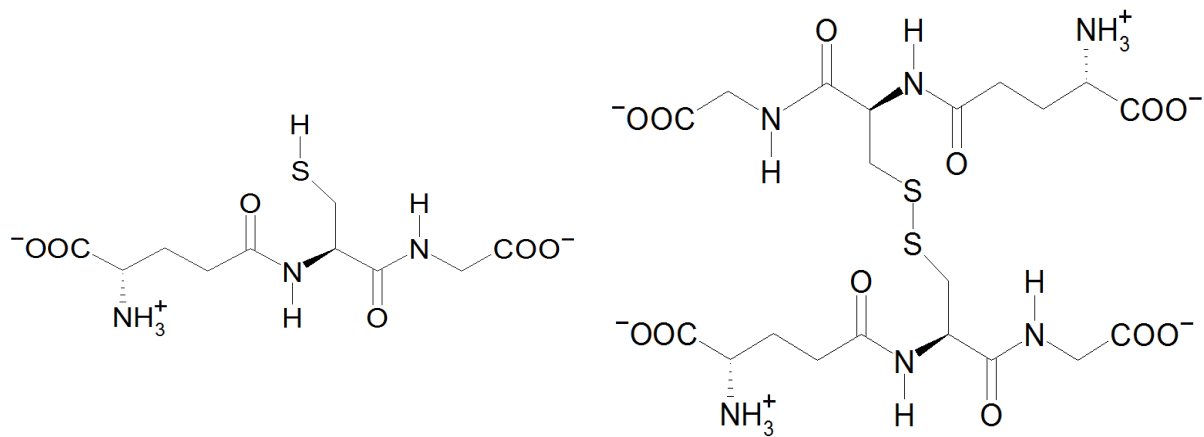


Abb. 1.10: Glutathion (links) und oxidiertes Glutathion (rechts)

2.3.3.4 Nicht-enzymale Antioxidantien

Vitamin E (α -Tocopherol):

Vitamin E ist eines der wichtigsten lipidlöslichen Antioxidantien. Es wirkt vorwiegend in der Zellmembran und fängt dort durch Lipidoxidation entstandene Radikale ab. Vitamin E ist als Radikal resonanzstabilisiert (**Abb. 1.11**) und somit langlebiger als andere Radikale. Somit wird die radikalische Kettenreaktion unterbrochen.

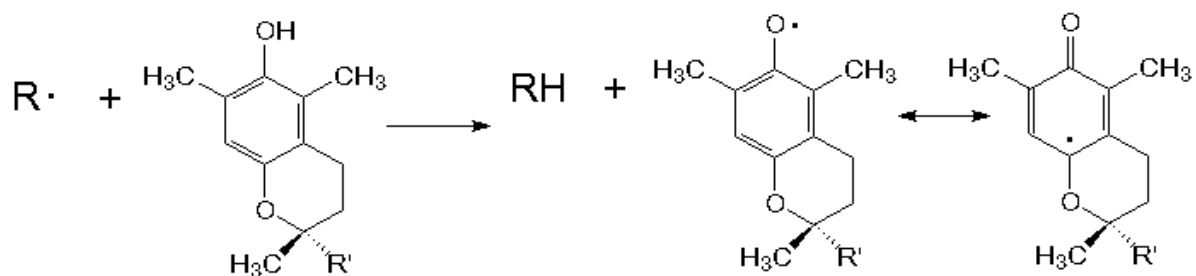


Abb. 1.11: Vitamin E als resonanzstabilisiertes Radikal

Vitamin C (Ascorbinsäure):

Vitamin C ist im Gegensatz zu Vitamin E wasserlöslich. Neben dem Abfangen vom Sauerstoffradikalen dient es vor allem dazu Vitamin E wieder zu regenerieren. Vitamin C

selbst wird durch die Enzyme Semidehydroascorbatreduktase und Dehydroascorbatreduktase unter NADPH-Verbrauch wieder regeneriert (Kojo et al., 2004).

Ubichinon (Coenzym Q):

Ubichinon nimmt eine Sonderrolle ein, da es das einzige lipidlösliche Antioxidans ist, das tierische Zellen selbst synthetisieren. Die lange Isoprenoidkette an der 6-Position erlaubt die Inserierung von Ubichinon in die Membran. Ubichinon ist vor allem in Mitochondrien lokalisiert, wo es an der Atmungskette teilnimmt, aber auch die Mitochondrienmembran vor oxidativem Schaden schützt (Genova et al., 2003).

Harnsäure

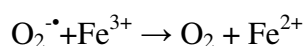
Harnsäure wird im Zuge des Purinabbaus gebildet. Durch die relativ hohe Konzentration und das Reduktionspotential von 0,59V bei pH 7 eignet sie sich als Antioxidans, das nach Abfangen eines Radikals als resonanzstabilisiertes Uratradikalanion vorliegt. Dieses kann durch Oxidation zu Allantoat umgewandelt werden, welches in Harnstoff und Oxalsäure gespalten werden kann (Becker, 1993).

2.3.3.5 Sonstige antioxidative Mechanismen

Wie bereits beschrieben, können auch freie Metallionen wie Kupfer oder Eisen oxidative Prozesse auslösen. Dies geschieht über die so genannte Haber-Weiss-Reaktion:



Die Schwermetallionen-katalysierten Teilreaktionen werden auch als Fentonreaktion bezeichnet:



Aus diesem Grund ist es wichtig, dass freie Schwermetallionen komplexiert werden, z.B. durch Transferrin, Ferritin, Albumin oder Caeruloplasmin (Halliwell & Gutteridge, 1999).

2.3.4 Plasmalogene und oxidativer Stress

Die Rolle von Plasmalogen im Bezug auf oxidativen Stress wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Als Bestandteil der Membran nehmen sie an oxidativen Prozessen wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben teil. Es ist aber nicht vollkommen klar, ob Plasmalogene dort eine antioxidative Funktion haben. Mehrere *in vitro* Versuche zeigten, dass Liposomen mit Plasmalogenen weniger anfällig für Oxidationschäden sind. So wurde der oxidative Abbau von PUFAs in Lipidextrakten mit Plasmalogen deutlich verlangsamt im Vergleich zu einem Extrakt ohne Plasmalogene (Sindelar et al., 1999; Reiss et al., 1997). Auch die Oxidation von Cholesterol in Liposomen wird durch die Anwesenheit von Plasmalogenen verhindert bzw. verzögert (Maebe et al., 2002). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass Plasmalogene zumindest in *in vitro* Versuchen die Fähigkeit besitzen freie Metallionen wie z.B. Kupfer zu binden und so oxidative Prozesse zu unterbinden (Hahnel et al., 1999).

Wie schon in Kapitel 1.1.3 angesprochen zeigen PL-defiziente Zellen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber UV-induziertem oxidativen Stress (Hoefer et al. 1991, Zoeller et al. 1988).

Entgegensetzt dazu zeigen Astrozyten, die Lactat-induziertem oxidativen Stress ausgesetzt waren, keinen gesteigerten Plasmalogenabbau (Fauconneau et al., 2001). Zudem konnte mittels Massenspektrometrie und Kernspinresonanzspektroskopie demonstriert werden, dass die Abbauprodukte, die bei der Lipidperoxidation von Plasmalogenen entstehen, nicht minder gefährlich für die Zelle sind als Abbauprodukte von anderen Lipiden. Das Aufbrechen der Etherbindung an der sn1-Position setzt einen reaktiven Aldehyd frei, der mit einer Aminogruppe aus der direkten Umgebung, von Lipiden oder Proteinen, eine Schiffssche Base formt (Stadelmann-Ingrand et al., 2001 und 2004).

2.4 Die Plasmalogen-defiziente Maus als Modell

Für diese Arbeit wurde eine PL-defiziente Mauslinie verwendet, an der schon mehrere Phänotypen dokumentiert wurden. So besitzen diese Mäuse sehr wenig Körperfett, verschiedene Defekte im ZNS, darunter eine verlängerte nicht-myelinisierte Zone des *Nervus opticus*, ihre Augen zeigen einen Katarakt, und die Männchen sind nicht fruchtbar.

Fibroblasten zeigen eine ungewöhnliche perinukleäre Ansammlung von Cholesterin (Rodemer et al. 2003).

2.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist eine vergleichende Untersuchung des ZNS von Kontroll- und PL-defizienten Mäusen. Ausgehend von den elektrophysiologischen und immunhistologischen Ergebnissen meiner Diplomarbeit, die einen Myelinisierungsdefekt in PL-defizienten Tieren andeuteten, sollte mit Hilfe von weiteren immunhistologischen Färbungen, sowie Elektronenmikroskopie und immun- und biochemischen Methoden die Effekte von PL-Defizienz auf das Nervensystem des Mausmodells aufgeklärt werden.

3 Material

3.1 Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Nicht näher bezeichnete Chemikalien und Verbrauchsartikel wurden von folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt), Bio-Rad (München), J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Eppendorf AG (Hamburg), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

3.2 Spezielle Chemikalien und Artikel

3.2.1 Chemikalien und Artikel

- Acrylamidstammlösung (Rotiphorese[®] Gel 30), Carl Roth, Karlsruhe
- Ammoniumperoxidsulfat (APS), Carls Roth, Karlsruhe
- β -Mercaptoethanol, Bio-Rad, München
- Bovines Serum-Albumin (BSA) Fraktion V, AppliChem, Darmstadt
- Bromphenolblau, Chroma Gesellschaft, Köngen
- Desferal, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid hydrochlorid (EDAC), Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Filipin, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Fluo4-AM, Invitrogen, Karlsruhe
- Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz, Fluka, Buchs, Schweiz
- Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion), Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Milchpulver, Carl Roth, Karlsruhe
- Natriumdodecylsulfat (SDS), ICN, Eschwege

- Natriumthiosulfat, Ferak, Berlin
- Pluronic acid F-127, BASF, Ludwigshafen
- Polyvinylpyrrolidon (PVP) 25, Merck, Darmstadt
- Roti[®]-Blue kolloidal Coomassie (5x Konzentrat), Carl Roth, Karlsruhe
- Serva Blue R (Coomassie Brilliant Blue R-250), Serva, Heidelberg
- SuperFrost[®] Plus Objektträger, Menzel-Gläser, Braunschweig
- N,N,N',N'-Tetrametylendiamin (TEMED), Bio-rad, München
- OCT-mounting medium, Tissue-Tek[®], Zoeterwoude
- Triton X-100, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Ziegenserum, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

3.2.2 Zellkulturmedien und –lösungen

Standardmedien und –lösungen für die Kultur der Zelllinien wurden von Biochrom KG, Berlin bezogen. Darüber hinaus kam folgende Substanz zum Einsatz:

- L-Glutamin, AppliChem, Darmstadt

3.3 Häufig verwendete Puffer

Folgende Puffer und Lösungen fanden in unterschiedlichen Methoden Verwendung und sind deshalb hier zusammengetragen.

PBS:	140 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	1,5 mM KH ₂ PO ₄
	5,4 mM Na ₂ HPO ₄

3.4 Geräte

Eppendorf Zentrifuge 5417R, Heraeus Biofuge Fresco, Bio-Rad MyCycler, Heraeus LaminAir® HB2436, Heraes BBD 6220, Heraeus Megafuge 1.0 R, Thermo Forma Inkubator, Heraeus HeraSafe® KSP, Leica VT1000S, Olympus BX81, Zeiss LSM 510, Cryostat CM 3050S, Dosaka DTK-1000 Microslicer, Zeiss EM 906E, Odyssey LI-COR, Amersham Ultrospec 1100 pro, Leica TCS SP2, Nanodrop, Braun Potter S Homogenistor, Molecular Devices Spectramax Gemini XS

3.5 Antikörper

3.5.1 Primärantikörper

Verwendete Erstantikörper sind in nachfolgender Tabelle (**Tab. 2.1**) zusammengefasst.

Name	Firma	Antigen	Verd.	aus	monokl.	Verw.
MBP (ab7349)	Abcam	Gesamtprotein aus Kuh	1000	Ratte	ja	WB, IHC
β-Tubulin	Sigma	Gesamtprotein aus Ratte	2000	Maus	ja	WB
CASPR	Neuromab	Ratte Peptid 1929-2009	500	Maus	ja	IHC
Na ⁺ -Kanal	Millipore	Loop III-IV	100	Kaninchen	nein	IHC
K _v 1.2	Neuromab	Ratte Peptid 428-499	200	Maus	ja	IHC
IP3R1 (ab5908)	Abcam	Mensch Peptid 1829-1848	500	Kaninchen	nein	IHC
Calbindin	Swant	Gesamtprotein aus Hühnchen	2000	Maus	ja	IHC
Calbindin	Swant	Gesamtprotein aus Ratte	2000	Kaninchen	nein	IHC
VGluT2	Synaptic	Ratte Peptid	2000	Kaninchen	nein	IHC

Systems		510-589				
VGluT1	Synaptic Systems	Ratte Peptid 456-560	2000	Kaninchen	nein	IHC
Rab5	BD Transduction Labs	Mensch Peptid 1-215	100	Maus	ja	IHC
EEA1	BD Transduction Labs	Mensch Peptid 3-281	100	Maus	ja	IHC
Clathrin Heavy Chain	Santa Cruz	C-Terminales Peptid	100	Ziege	nein	IHC
Cathepsin D	Santa Cruz	C-Terminales Peptid	100	Ziege	nein	IHC
Pan-Cadherin	Sigma	C-Terminales Peptid aus Hühnchen	100	Kaninchen	nein	IHC
SNAP-25	Sigma	Mensch Peptid 9-29	100	Kaninchen	Nein	IHC
α -Synuclein	BD Transduction Labs	Ratte Peptid 15-123	1000	Maus	ja	IHC
Synaptotagmin I	Sigma	Ratte Peptid 1-16	100	Kaninchen	nein	IHC
GM-130	Lab Wieland		100	Maus		IHC
PDI	Lab Wieland		500	Kaninchen	nein	IHC

Tab. 2.1: Verwendete Antikörper. Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Verdünnungen (Verd.) mit 5% BSA im jeweiligen Puffer des Versuchs angesetzt. Abkürzungen: IHC – Immunhistochemie; WB – Western Blot; monokl. – monoklonal; CASPR – *Contactin associated protein*; K_v1.2 – *spannungsabhängiger Kaliumkanal 1.2*; IP3R1 – *Inositoltriphosphatrezeptor Isotyp 1*; VGluT – *vesikulärer Glutamattransporter*; EEA1 – *early endosomal Antigen 1*; SNAP-25 – *Synaptosome associated protein 25kDa*; PDI – *protein disulfide isomerase*

3.5.2 Sekundärantikörper

Als Sekundärantikörper für Western Blots dienten folgende Alexa Fluor® 680 markierten Antikörper der Firma Invitrogen (Karlsruhe):

- Alexa Fluor® 680 Ziege anti-Ratte IgG-Gesamtantikörper (H + L)
- Alexa Fluor® 680 Ziege anti-Maus IgG-Gesamtantikörper (H + L)

Die Verdünnung betrug 1:5000 in PBS mit 3% BSA und 0,01% SDS.

Für die Immunofluoreszenz wurden folgende Antikörper von der Firma Invitrogen und Sigma-Aldrich verwendet:

- Alexa Fluor® 488 Ziege anti-Maus IgG-Gesamtantikörper (H + L)
- Alexa Fluor® 546 Ziege anti-Maus IgG-Gesamtantikörper (H + L)
- Alexa Fluor® 488 Ziege anti-Kaninchen IgG-Gesamtantikörper (H + L)
- FITC (Fluorescein Isothiocyanate)-markierter Ziege anti-Ratte IgG-Gesamtantikörper (H + L)
- FITC-markierter Ziege anti-Maus IgG-Gesamtantikörper (H + L)
- FITC-markierter Kaninchen anti-Ziege IgG-Gesamtantikörper (H + L)
- TRITC (Tetramethylrhodamin Isothiocyanat)-markierter Ziege anti-Maus IgG-Gesamtantikörper (H + L)
- TRITC (Tetramethylrhodamin Isothiocyanat)-markierter Ziege anti-Kaninchen IgG-Gesamtantikörper (H + L)

Für die Alexa-markierten Antikörper betrug die Verdünnung 1:1000 und für die FITC/TRITC-markierten jeweils 1:100 in PBS mit 0,3% Triton X-100 und 10% BSA.

3.5.3 Blockantikörper

Um zwei monoklonale Mausantikörper in der Immunofluoreszenz benutzen zu können, wurden folgende Antikörper der Firma Dianova (Hamburg) zum Blocken verwendet:

- Maus anti-Mensch IgG (H + L)
- Ziege anti-Maus IgG Fab-Fragment (H + L)

Beide Antikörper wurden jeweils mit einer Konzentration von 50µg/ml in PBS mit 1% BSA eingesetzt.

3.6 Molekulargewichtstandards

3.6.1 Vorgefärbter Standard (Prestained)

PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)

170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 33 kDa, 24 kDa, 17 kDa und 11 kDa.

3.6.2 1 kb-DNA-Standard

Der Größenstandard, der für die gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten verwendet wurde, war ein Produkt von New England Biolabs GmbH (Frankfurt) mit den DNA-Fragmentgrößen 0,5 kb, 1 kb, 1,5 kb, 2 kb, 3 kb, 4 kb, 5 kb, 6 kb, 8 kb, 10 kb.

3.6.3 100 bp-DNA-Standard

Der Größenstandard, der für die gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten verwendet wurde, war ein Produkt von New England Biolabs GmbH (Frankfurt) mit den DNA-Fragmentgrößen 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1 kb, 1,2 kb, 1,5 kb.

3.7 Versuchtiere und Haltung

Als Versuchstiere dienten Mäuse des Stammes C57B/6, die im Zentralen Tierlabor der Universität Heidelberg gezüchtet wurden. Es wurden Wildtyp (wt)- und Knockout (ko)-Mäuse mit PL-Defizienz analysiert (Konstrukt DHAPAT, Rodemer et al., 2003).

Die verwendeten Mäuse wurden im Zentralen Tierlabor in Makrolonkäfigen unter Standardbedingungen (22-24°C, Tag/Nacht-Rhythmus 8-22 Uhr) gehalten. Ihre Ernährung bestand aus Standarddiät (Sniff, Soest) und Wasser ad libitum. Da DHAPAT^{-/-} - Mäuse steril sind, wurden zur Weiterzucht nur heterozygote Tiere verpaart. Gegebenenfalls wurde die Bildung des Verpaarungspropfes überprüft, um den genauen Tag der Verpaarung bestimmen zu können.

Zur Überprüfung des Genotyps wurde den Tieren ein ca. 0,5 cm langes Schwanzstück abgenommen. Der restliche Schwanz wurde sofort versorgt. Bei Neugeborenen wurde ein Teil des Kopfes nach Entnahme des Gehirns für die Zellkultur verwendet. Die Gewebestücke wurden bei -20°C eingefroren und später der Genotyp analysiert. Zur eindeutigen Unterscheidung der Individuen während der Zucht wurden die Ohren in charakteristischer Weise gelocht.

4 Methoden

4.1 Biochemische Methoden

4.1.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Diese Art der Proteinbestimmung ist eine weit verbreitete und sensitive Methode, die zuerst von Lowry et al. (1951) beschrieben wurde. Hierbei macht man sich die unter alkalischen Bedingungen auftretenden Komplexbildung von Kupferionen an Proteinen zunutze. Zugegebene Folin-Phenol-Reagenz bindet an die Proteine, wird langsam reduziert und verändert seine Farbe von gelb nach blau. Die Stärke der Farbe kann colorimetrisch bei 620 nm erfasst werden. Zur Bestimmung der Absorption ist eine Serie von Proteinstandards (0-30 µg Protein), im allgemeinen BSA, nötig, um die Testsubstanz quantitativ zu erfassen.

Alle Proben mussten vor dem Test mit Trichloressigsäure (TCA) oder Aceton gefällt werden. Für diese Arbeit wurden die Proben weitestgehend mit TCA gefällt. Die Proben wurden mit 1 x Probenpuffer verdünnt und eine entsprechende Menge mit 20% TCA-Lösung (Endkonzentration: 10%) und 0,1% Deoxycholat (DOC) (Endkonzentration: 0,01%) versetzt. Nach 20 Minuten auf Eis wurden sie bei 20,817 g_{AV} und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet für 10 min bei 37°C getrocknet, bevor es in 225 µl Lowry A aufgenommen und 10 Minuten bei 50°C unter Schütteln gelöst wurde. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur (RT) wurden 25 µl Lowry B hinzugegeben und anschließend 15 Minuten bei RT geschüttelt. Abschließend erfolgte die Zugabe von 750 µl Lowry C (eine 1:12,5 Verdünnung mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O)) mit sofortigem Vortexen und eine 10minütige Inkubation bei 50°C. Nach Abkühlen auf RT wurde die Absorption der Proben bei 620 nm im Photometer gemessen. Der Proteingehalt der Proben wurde anhand des Proteinstandards kalkuliert.

Lowry A: 200 mg KNa-Tartrat
10 g Na₂CO₃
in 50 ml 1 N NaOH lösen und auf 100ml mit ddH₂O auffüllen

Lowry B:	2 g KNa-Tartrat
	1 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$
	in 90 ml ddH ₂ O lösen und 10 ml 1 N NaOH zugeben
Lowry C:	fertige Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz
	vor Gebrauch 1:12,5 mit ddH ₂ O verdünnen
1x Probenpuffer:	10 mM TrisHCl (pH 8,0)
	1 mM EDTA
	4% (w/v) SDS
	10% (w/v) Glycerin
	5% (v/v) β -Mercaptoethanol
	Bromphenolblau bis zu intensiven Blaufärbung

4.1.2 Probenvorbereitung für SDS-Page

Die bereits in 1 x Probenpuffer gelösten Proteine wurden vor dem Auftragen 10 Minuten bei 70°C bzw. fünf Minuten bei 95°C erhitzt und anschließend mögliche Aggregate durch Zentrifugation für eine Minute bei 13.000 g_{AV} und RT (Heraeus Biofuge Fresco) entfernt.

4.1.3 SDS-Page

SDS-denaturierte Proteine wurden respektiv ihrem jeweiligen Molekulargewicht in einem modifizierten diskontinuierlichen System nach Laemmli (Laemmli et al., 1970) elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden vertikale Polyacrylamid-Gelsysteme in der Größe 5 ml (Minigele) und der Dicke 0,7 mm oder vorgefertigt 10-20% Tris/Tricinegele in der Größe 10 cm und der Dicke 1 mm der Firma Anamed (Groß-Bieberau) verwendet.

Bei den selbstgefertigten Gelen betrug die Acrylamidkonzentration des Trenngels 12,5%, die des Sammelgels 4% bei allen verwendeten Gelen. Zur Polymerisierung der Trenngele wurden 0,1% (w/v) APS und 0,05% (v/v) TEMED bzw. entsprechend für die Sammelgele 0,1% (w/v) APS und 0,01% (v/v) TEMED eingesetzt.

Die angefertigten Gele liefen konstant bei 15 mA bis zum Austritt der Bromphenolblaufront sowohl im Sammel- als auch im Trenngel. Während der gesamten Zeit lag die maximal erreichbare Spannung bei 180 V. Als Laufpuffer wurde 2 5mM Tris/HCl (pH 8,8) mit 0,192 M Glycin und 0,1% SDS verwendet.

Die vorgefertigten Gele liefen konstant bei 125 V mit einer Stromstärkenbegrenzung von 100 mA ebenso bis zum Austritt der Bromphenolblaufront nach ca. 90 Minuten mit einem Laufpuffer von 0,1 M Tris, 0,1 M Tricine und 0,1% SDS.

Trenngel-Acrylamid:	30% (w/v) Acrylamid 0,8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid
4 x Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) 0,4% (w/v) SDS
Sammelgel-Acrylamid:	4% (w/v) Acrylamid 15% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid
4 x Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8) 0,4% (w/v) SDS
APS-Stammlösung:	10% (w/v) Ammoniumperoxidsulfat
10 x Elektrophorespuffer:	250 mM Tris/HCl (pH 8,8) 1,92 M Glycin

1% (w/v) SDS

10 x Anamedgelpuffer: 1 M Tricine
 1 M Tris
 1% (w/v) SDS

4.1.4 Nachweis von Proteinen in SDS-Gelen

4.1.4.1 Färbung mit kolloidalem Coomassie

Zur Überprüfung der Lademenge und zur Vorbereitung einer Analyse mit Hilfe der Massenspektrometrie wurden die SDS-Polyacrylamidgele mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Dazu wurde zunächst das SDS-Gel in Fixierlösung für eine Stunde bei RT unter Schütteln inkubiert und anschließend mit frisch angesetzter Färbelösung versetzt. Die Färbung erfolgte über Nacht (ÜN) bei 4°C im Kühlraum.

Das gefärbte Gel wurde mittels Waschlösung entfärbt bis die blauen Proteinbanden deutlich zu erkennen waren (ca. fünf Minuten). Im Falle, dass das Gel getrocknet werden sollte, wurde es in Stabilisationslösung aufbewahrt.

Fixierlösung: 20% (w/v) TCA-Lösung

Färbelösung: 20% (v/v) Methanol
 20% (v/v) Roti[®]-Blue 5 x Konzentrat

Waschlösung: 25% (v/v) Methanol

Stabilisationslösung: 10 g Ammoniumsulfat in 50 ml ddH₂O

Arbeitsschritt	Inkubationsdauer
1. Fixierung	1 h bei RT
2. Färben	ÜN bei 4°C
3. Waschen/Entfärben	ca. 5 min
4. Stabilisieren	unbegrenzt

Tab. 3.1: Arbeitsschritte für kolloidale Coomassiefärbung

Die massenspektrometrische Analyse wurde im Labor von Prof. Lechner wie beschrieben (Scharfenberger et al., 2003) durchgeführt.

4.1.4.2 Silberfärbung

Um Proteine im Nanogramm-Bereich (1-10 ng/Bande) zu detektieren, wurden diese in SDS-Gelen durch Silberauflagerungen nachgewiesen (Oakley et al. 1980). Hierbei macht man sich zunutze, dass schwefelhaltige und basische Aminosäurereste Silberionen zu metallischem Silber reduzieren, das als bräunliche Färbung im Gel sichtbar wird. Die hier verwendete Methode ist eine Modifikation von Li-Tai Jin et al. (2004).

Zunächst wurden die Proteine mit einer Ethanol/Essigsäurelösung in Gel fixiert. Zur Vorbereitung auf die anschließende Färbung wurde das Gel in Lösung I fünf Minuten inkubiert. Die darin enthaltene Calconcarbonsäure erhöht die Empfindlichkeit der Färbung. Nach zweimaligen Waschen in Fixierlösung für drei Minuten und zweimaligen Waschen in ddH₂O für zwei Minuten wurde das Gel 20 Minuten in Silbernitrat (Lösung II) inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein zweimaliges kurzes Waschen mit ddH₂O und die Entwicklung der Färbung bis zur gewünschten Intensität mit Lösung III (Reduktionsschritt). Die Reaktion wurde mittels EDTA (Lösung IV) gestoppt, woraufhin das Gel ausgewertet werden konnte. Die jeweiligen Arbeitsschritte sind in **Tab. 3.2** zusammengefasst.

Fixierlösung:

- 40% (v/v) Ethanol
- 10% (v/v) Essigsäure
- 50% (v/v) ddH₂O

- Lösung I: 2,5 mg Calconcarbonsäure
2 ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (aus einer 0,1% [w/v] Stocklösung)
mit Fixierlösung auf 50 ml auffüllen
- Lösung II: 0,125 g AgNO_3
45 μl Formaldehyd
mit ddH₂O auf 50 ml auffüllen
- Lösung III: 1,5 g K_2CO_3
45 μl Formaldehyd
200 μl $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,1% [w/v] Stocklösung)
mit ddH₂O auf 50 ml auffüllen
- Lösung IV: 0,75 g EDTA
mit ddH₂O auf 50 ml auffüllen

Arbeitsschritt	Lösung	Inkubationsdauer
1. Fixierung	Fixierlösung	1 h bei RT
2. Sensitivieren	Lösung I	5 min
3. 2 x Waschen	Fixierlösung	3 min
4. 2 x Waschen	ddH ₂ O	2 min
5. Färbung	Lösung II	20 min
6. 2 x Waschen	ddH ₂ O	20 s
7. Entwickeln	Lösung III	bis Färbung

8. Stoppen	Lösung IV	unbegrenzt
------------	-----------	------------

Tab. 3.2: Arbeitsschritte für Silberfärbung

4.1.5 Western-Blot

4.1.5.1 Proteintransfer auf PVDF-Blotmembran

Zur Detektion mittels Antikörper wurden die Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Blotmembran (Fluorotrans W, Pall, Wiesbaden) transferiert. Der Transfer erfolgte nach dem Naßblot-Prinzip in einer Apparatur der Firma Bio-Rad (München). Dazu wurde ein Membranstück, das der Größe des SDS-Gels entsprach, zunächst für eine Minute bei RT mit Methanol benetzt und dann in 1 x Blotpuffer äquilibriert. Das Gelstück wurde kurz in Blotpuffer inkubiert, dann luftblasenfrei auf die Membran aufgelegt und zwischen zwei in Blotpuffer getränkten Whatman 3MM-Filterpapieren in die entsprechende Naßblot-Kammer (Mini Trans-Blot, Bio-Rad, München) eingesetzt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 1,25 Stunden bei konstant 400 mA in Blotpuffer.

1 x Blotpuffer: 50 mM Natriumborat (pH 9,0)
 5% (v/v) Methanol
 0,05% (w/v) SDS

4.1.5.2 Immunchemischer Nachweis von Proteinen

Nach dem Proteintransfer auf die PVDF-Blotmembran wurde die Membran zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindung mit 5% (w/v) BSA in 1 x PBS abgesättigt. Das Blockieren erfolgte für eine Stunde bei RT oder alternativ ÜN bei 4°C im Kühlraum. Alle nun folgenden Schritte fanden, sofern nicht anders erwähnt, bei RT statt.

Nach Waschen der Membran für zweimal 10 Minuten in PBS-T folgte die Inkubation mit Primärantikörper (in PBS-T mit 1% BSA) für eine Stunde (alternativ ÜN bei 4°C) unter leichtem Schütteln. Anschließend wurde die Blotmembran zweimal fünf Minuten in PBS-T

gewaschen und mit dem entsprechenden Alexa Fluor® 680 Sekundärantikörper (in PBS-T mit 3% BSA und 0,01% SDS) für insgesamt 45 Minuten inkubiert. Im letzten Schritt wurde die Membran abermals für dreimal fünf Minuten in PBS-T gewaschen und der Blot entwickelt.

Zur Detektion wurde das Infrarot-Bildsystem Odyssey der Firma Li-Cor (Bad Homburg) verwendet.

Blockierlösung: 5% (w/v) BSA in 1 x PBS

PBS-T: 0,05% TWEEN-20 in 1 x PBS

4.1.5.3 Auswertung

Die quantitative Auswertung der Signale erfolgte in der mitgelieferten Software der Firma Li-Cor. Die gemessenen Werte wurden anhand einer Ladekontrolle überprüft und korrigiert.

4.1.5.4 Färbung der Blotmembran mit Coomassie Brilliant Blue R-250

Zum Nachweis von Proteinmengen im Bereich 100-500 ng pro Bande wurde die PVDF-Blotmembran mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt. Dazu wurde die Membran 10 Minuten in der Färbelösung inkubiert und danach solange in Entfärbelösung gewaschen, bis sich die blauen Banden deutlich vom Hintergrund abzeichneten.

Färbelösung: 45% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure
0,5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250

Entfärbelösung: 40% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure

4.1.6 Oxidativer Stress

4.1.6.1 Probenvorbereitung

Im Rahmen der Untersuchungen zu Thema oxidativer Stress wurden Großhirn, Kleinhirn, Leber und Lunge untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Tiere nach entsprechender Betäubung dekapitiert und die Organe entnommen und sofort in flüssigen Stickstoff bis zur Homogenisierung eingefroren. Diese erfolgte im Oxohomopuffer mittels eines Braun Potter S Homogenisators bei 700 Umdrehungen für ca. 30 Sekunden mit anschließendem sofortigem Wiedereinfrieren in flüssigem Stickstoff.

Die Messungen der folgenden Kapitel bis einschließlich 3.1.6.4 erfolgten am gleichen Tag. Für spätere Messungen wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Oxohomopuffer: 140 mM KCl
20 mM PBS (pH 7,4)

xx μ l Probe
ad 3 ml PBS (pH 8,6)

Eine 100 μ M Lösung von 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), ein wasserlösliches Vitamin E-Analogon, diente als Standard.

4.1.6.3 Thiobarbiturat reaktive Substanzen (TBARS)

Um spezifischer die Abbauprodukte von Lipidperoxidation zu messen, wurde mittels eines Assays mit Thiobarbiturat der Gehalt von Malondialdehyd (**Abb. 3.2**), einem Abbauprodukt der Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, in den Proben bestimmt.

Als Standard wurde Tetraethoxypropane verwendet, das im sauren pH-Bereich Malondialdehyd (MDA) freisetzt.

Alle Proben wurden mit 0,01 N HCl auf 400 μ l aufgefüllt und mit 1 ml TBAR-Reagenz 30 Minuten bei 95°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf RT wurde der entstandene Farbstoff mit 400 μ l Butanol-1 und einer fünfminütigen Zentrifugation mit 13000g_{AV} extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend in einem Platerader Spectramax Gemini XS (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) fluorimetrisch gemessen (λ_{Ex} : 515 nm; λ_{Em} : 553 nm) und der MDA-Gehalt anhand des Standards berechnet.

TBAR-Reagenz: 0,375% (w/v) Thiobarbiturat
15% (v/v) TCA
in 0,25 N HCl

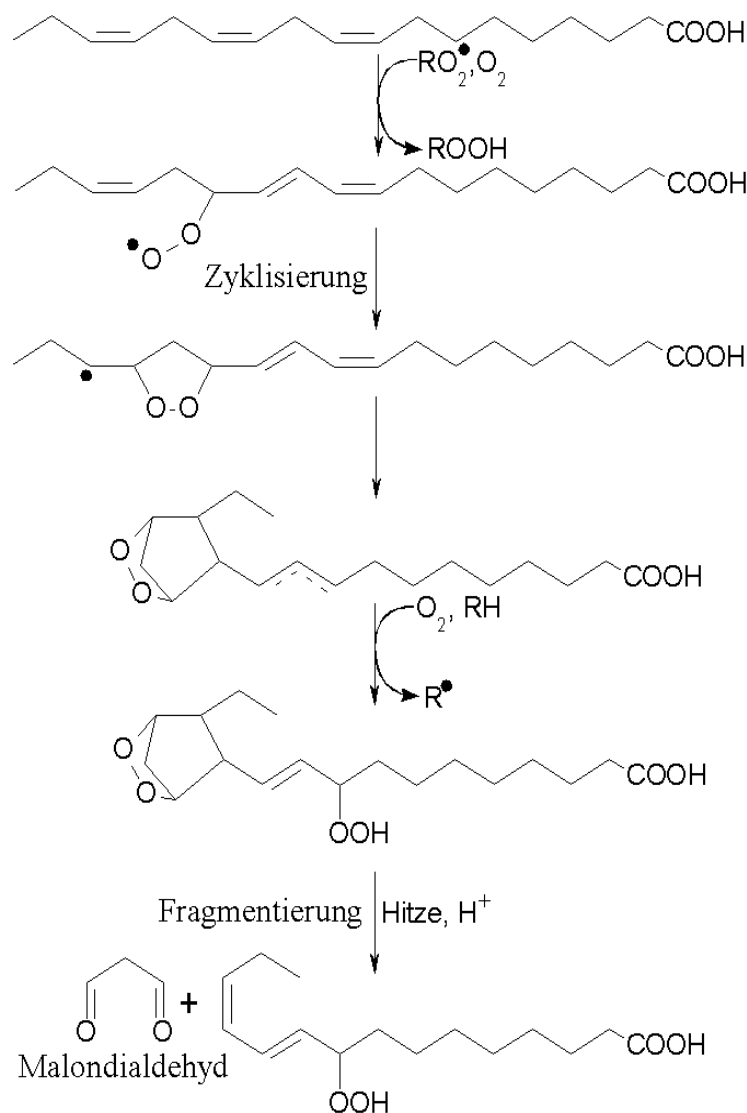


Abb. 3.2: Lipidperoxidation von α -Linolensäure und Entstehung von MDA (nach Belitz et al., 1992)

4.1.6.4 Glutathionmessung

Die Messung von sowohl reduziertem als auch oxidiertem Glutathion beruht auf der Reaktion der Thiolgruppe mit 5,5'-DithioBis(Nitrobenzoesäure) (DTNB) der so genannten Ellmans Reagenz (Boyne et al., 1972). Im Falle des oxidierten Glutathions (GSSG) muss das Dimer erst durch Reduktions mittels Glutathionreduktase (ein Geschenk der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Krauth-Siegel) und NADPH freigesetzt werden. Zuvor muss das bereits in der Probe vorliegende reduzierte Glutathion (GSH) mit 2-Vinylpyridin abreagiert werden. Als Standard diente aufgereinigtes Glutathion beiden Oxidationszustände.

Alle Proben und Standards wurden mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Für die Messung von GSSG wurden die Proben mit 1 M 2-Vinylpyridin vermischt (Endkonzentration: 10 mM) und eine Stunde bei RT inkubiert, bevor die Proben wie für die GSH-Messung weiter prozessiert wurden.

Zur Probe wurde der gleiche Volumenteil an 10% TCA zugegeben, gevortext und 10 Minuten mit 3000 Umdrehungen bei RT abzentrifugiert. 150 µl des Überstandes wurde mit 600 µl Tris/HCl (pH 8,9) und 60 µl Ellman Reagenz vermischt. Für die GSSG-Messung kamen 30 µl einer 24 mM NADPH-Lösung und 5 µl Glutathionreduktase (240 U/ml) hinzu. Die Lösungen wurden sorgfältig gemischt und die Absorption bei 412 nm mit dem Photometer bestimmt.

Ansatz:	150 µl Probe
	600 µl Tris/HCl (pH 8,9)
	60 µl Ellmans Reagenz
	30 µl NADPH (nur bei GSSG-Messung)
	5 µl Glutathionreduktase (nur bei GSSG-Messung)
Ellman Reagenz:	150 µM DTNB in Methanol
TEA-Puffer:	20 mM Triethanolamin in ddH ₂ O
GSH-Stock:	20 mM in TEA-Puffer
GSSG-Stock:	20 mM in TEA-Puffer
2-Vinylpyridin:	1 M in Ethanol

Tris/HCl (pH 8,9): 4,844 g Trizma Base
 0,832 g EDTA
 pH mit HCl auf 8,9 einstellen
 auf 100 ml mit ddH₂O auffüllen

NADPH-Lösung: 24 mM NADPH gelöst in Tris/HCl (pH 8,9)

4.1.6.5 Oxidation durch Fentonreaktion

Die Fentonreaktion bezeichnet man die Produktion von Hydroxylradikalen durch Fe²⁺. Das zugegebene Ascorbat reduziert das Eisenion wieder.



Die Probe wurde dazu mit Oxohomopuffer auf 80 µl aufgefüllt und 10 µl einer 200 µM FeCl₂-Lösung (Endkonzentration: 20 µM) sowie 10 µl einer 2,5 mM Ascorbatlösung (Endkonzentration: 250 µM). Mit diesem Ansatz wurde eine Kinetik über eine Stunde bei 37°C im Schüttler gemessen. Die Reaktion wurde mit 12,5 µl einer 10 mM Desferallösung (Endkonzentration: 1 mM) und 12,5 µl einer 2 mM butyliertes Hydroxytoluen (BHT; Endkonzentration: 200 µM) gestoppt und die Proben bis zur TBAR-Messung (wie in Kapitel 1.1.6.3 beschrieben) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Kontrolle wurden Ansätze ohne Fe²⁺ und Ascorbat durchgeführt.

Ansatz: 25 µl Probe
 10 µl 200 µM FeCl₂
 10 µl 2,5 mM Ascorbat
 ad 100 µl mit Oxohomopuffer

Reaktionstopp: 12,5 µl 10 mM Desferal
 12,5 µl 2 mM BHT

4.1.6.6 Lipidextraktion

Um speziell die Lipidperoxidation durch die Fentonreaktion zu analysieren, wurde aus den Homogenaten ein Lipidextrakt angefertigt. Die hier verwendete Methode beruht auf der Arbeit von Sindelar et al. (1999).

Im ersten Schritt wurde die Probe mit einem Gemisch aus Dichlormethan, Methanol und Wasser im Verhältnis 1:1:0,3 extrahiert, wobei die Phasentrennung durch eine Zentrifugation von 15 Minuten bei 4000 g_{AV} erreicht wurde, wie bei den folgenden Schritten auch. Die organische Phase wurde entnommen und in ein neues Gefäß überführt, während die wässrige Phase erst mit einer Dichlormethan/Methanol-Mischung im Verhältnis 2:1 und anschließend der Zugabe von 1 Teil (so dass ein Dichlormethan/Methanol-Verhältnis von 1:1 entsteht) nochmals extrahiert und die beiden Dichlormethanphasen vereinigt wurden. Die vereinigte organische Phase wurde auf ein Dichlormethan/Methanol/Wasser-Verhältnis von 3:2:1 eingestellt, die Phasen erneut getrennt und die organische Phase unter Stickstoff bei RT verblasen.

Die Lipide wurde in 1 ml Oxohomopuffer durch 45minütige Behandlung im eisgekühlten Ultraschallbad resuspendiert und dann wie in Kapitel 1.1.6.5 beschrieben der Oxidation durch Eisen und Ascorbat unterzogen, wobei die Volumina angepasst wurden. Die Extraktionsschritte sind nochmals in **Tab. 3.3** zusammengefasst.

Arbeitsschritt	Dichlormethan/Methanol/Wasser	Folgender Schritt
1. Extraktion	1:1:0,3	Entnahme der organischen Phase
2. Extraktion	2:1:0	-
3. Methanolzugabe	0:1:0	Entnahme der organischen Phase
4. Waschen der organischen Phase	3:2:1	Entnahme der organischen Phase
5. Verblasen	-	Zugabe von Oxohomopuffer
6. Resuspendieren	-	-

Tab. 3.3: Extraktionsschritte

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Fibroblasten in der Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten-Zelllinien wurden von Dr. Uma Jayachandran in unserer Arbeitsgruppe etabliert. Die Zellen wurden auf 10cm-Schalen bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit gehalten, wobei die Zellen alle 3-4 Tage mit frischem komplettierten DMEM (Dulbecco et al., 1959) versorgt wurden.

Wenn die Schalen mit Zellen konfluent (deckend) bewachsen waren, wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS-ZK gewaschen und mit wenigen Tropfen Trypsin von der Schale abgelöst, in Medium wieder aufgenommen und verdünnt wieder ausgesät.

4.2.1.1 Auftauen

Um eingefrorene Zellen wieder in Zellkultur zu nehmen, wurde ein Aliquot bei 37°C im Wasserbad zügig aufgetaut und nach vierminütiger Zentrifugation bei 200 g_{AV} wurde das Einfriermedium im Überstand entfernt und die Zellen in komplettierten DMEM wieder aufgenommen und ausplattiert.

4.2.1.2 Einfrieren

Um die jeweilige Zelllinie längere Zeit zu lagern, wurde eine 10cm-Schale wie oben beschrieben abtrypsiniert und in 3 ml komplettiertem DMEM wieder aufgenommen. Nach einer Zentrifugation von vier Minuten bei 200 g_{AV} wurde das Zellpellet vorsichtig in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und die ersten 24 h Stunden in Thermofolie verpackt langsam auf -80°C abgekühlt, bevor die Zellen schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

4.2.1.3 Fibroblasten unter oxidativem Stress

Für die Analyse von oxidativen Stress *in vivo* wurde die Resistenz von Fibroblasten sowohl von Kontroll- als auch PL-defizienten Tieren gegenüber verschiedenen Konzentrationen von ABAP getestet.

Zu diesem Zweck wurden die Fibroblasten auf 6Well-Platten ausplattiert. Bei ca. 90% Konfluenz wurde das Medium gewechselt und mit 0, 15 und 30 mM ABAP versehen. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen mit 200 µl Trypsin und 400 µl Medium abgelöst. 200 µl dieser Zellsuspension wurden mit 50 µl 0,5% (w/v) Trypan blau gemischt und 10 µl mit Hilfe einer Neubauerzählkammer ausgewertet.

4.2.2 Medien

Komplettiertes DMEM: DMEM
 1% (w/v) Penicillin/ Streptomycin
 10% (v/v) FCS, hitzeinaktiviert
 1% (w/v) L-Glutamin

Einfriermedium: 50% (v/v) komplettiertes DMEM
 40% (v/v) FCS, hitzeinaktiviert
 10% (v/v) DMSO

PBS-ZK (ohne Ca^{2+} / Mg^{2+}): 0,08% (w/v) NaCl
 0,02% (w/v) KCl
 0,115% (w/v) Na_2HPO_4
 0,02% (w/v) KH_2PO_4
 pH 7,4

Trypsin: 0,05% (w/v) $\text{Na}_2\text{-EDTA}$
 0,125% (w/v) Trypsin
 in 2,5 x PBS-ZK

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um heterozygote Tiere von wt- bzw. ko-Tieren zu unterscheiden, wurden bei adulten Mäusen der Genotyp des DHAPAT-Gens mithilfe der PCR analysiert. Den adulten Mäusen wurde routinemäßig – zur Kontrolle der Zucht – ca. sechs Wochen nach Geburt (bei Notwendigkeit auch bei jüngeren Tieren) und zusätzlichen während des Versuchs ein ca. 0,5 cm langes Schwanzstück abgenommen.

Die Gewebeproben wurden mit 200 µl 50 mM NaOH für zwei Stunden bei 95°C unter Schütteln aufgebrochen und anschließend mit 20 µl 1 M Tris/HCl (pH 8,0) nach dem Abkühlen versetzt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 4000 g_{AV} bei RT für 10 Minuten wurden 5 µl des Überstandes für den PCR-Ansatz verwendet.

Als Primer wurden folgende Oligonukleotide (Thermo Electron Corporation, Waltham, USA) verwendet:

- Antisense-Primer:

HA5as: 5' GCT CTC AAA CAG CTA CGT AGC TGA 3'

- Sense-Primer für das Exon 7 des DHAPAT-Gens:

Ex7-1s: 5' CGA TAC CTA CTT TGT CCC AAT TAG C 3'

- Sense-Primer für die Neomycinkassete:

neoHA1s: 5' CGC ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT G 3'

Pro Probe waren zwei Reaktionsansätze nötig, wobei der Antisense-Primer bei beiden Reaktionen gleich war.

PCR-Ansätze: 5 µl 10 x Reaktionspuffer (Axon, Kaiserslautern)
1 µl Antisense-Primer (20 µM)

1 µl Sense-Primer (20 µM)
1 µl dNTPs (200 µM)
5 µl MgCl₂ (2,5 mM)
0,5 µl Taq-DNA-Polymerase (Axon) (5 Units/µl)
ad 45 µl ddH₂O

Zu diesem Ansatz wurde 5µl Überstand zugegeben.

PCR-Programm:	1. Schritt:	2 min 95°C
	2. Schritt (35x):	30 s 94°C
		30 s 57°C
		1 min 72°C
	3. Schritt:	2 min 72°C
	4. Schritt:	∞ 4°C

Die PCR-Produkte wurden anschließend bei 4°C aufbewahrt.

4.3.2 Gelelektrophorese von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte wurden in horizontalen Flachbett-Agarosegelen aufgetrennt. Dafür wurden 1%ige Agarosegele mit 0,3 µg/nl Ethidiumbromid verwendet. Jeweils 15 µl Probe wurden mit 3 µl 6 x Auftragspuffer versetzt und in die Taschen gefüllt. Als Größenstandard diente ein 1 kb DNA-Marker für die Neomycin-PCR und ein 100 bp DNA-Marker für die Exon7-PCR (NEB, Frankfurt). Die Gele liefen bei 180 V in TAE-Puffer (submarine Elektrophorese), bis die Bromphenolblaufront die Hälfte der Gellänge erreicht hatte. Die Eigenschaft von Ethidium – starke Zunahme der Fluoreszenz, wenn Ethidium zwischen die DNA-Basenpaaren

interkaliert, im Vergleich zu gelöstem Ethidium – wurde ausgenutzt, um die Gele durch UV-Bestrahlung in einem Bio-Rad Geldokumentationssystem (Geldoc) festzuhalten.

TAE-Puffer: 40 mM Tris/Acetat (pH 8,5)
 1 mM EDTA

6 x Auftragspuffer: 40% (w/v) Saccharose
 Bromphenolblau bis zur intensiven Blaufärbung

4.3.3 RNA-Isolierung für Microarray-Analyse

Um Unterschiede im Expressionsmuster verschiedener Gene im Kleinhirn zwischen Kontrollen und PL-defizienten Tieren zu analysieren, wurde die RNA sowohl von Kontroll- als auch Knockouttieren mit dem PureLink™ RNA mini Kit von Invitrogen aufgereinigt.

Die Tiere wurden dekapitiert und das Kleinhirn präpariert. Anschließend wurde das Gewebe in 1 ml Trizol homogenisiert und das Homogenat fünf Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und kurzem Mischen wurde erneut für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und folgend bei 12000g_{AV} für 15 Minuten die Phasen getrennt. Die obere, die RNA enthaltende Phase wurde abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und ein Volumen 70% Ethanol dazugegeben. Danach wurden 700 µl der Probe auf die Säule geladen und 15 Sekunden bei 12000g_{AV} zentrifugiert (wie alle folgenden Schritte auch, sofern nicht anders angegeben). Die letzten beiden Schritte wurden wiederholt bis die gesamte Probe auf die Säule geladen war, gefolgt von einem Waschschrift mit 700 µl Waschpuffer 1 und nachfolgend zweimal 500 µl Waschpuffer 2. Nach dem Trocknen der Säule mit einer einminütigen Zentrifugation bei 12000g_{AV}, wurde die Säule mit 50 µl RNAfreiem Wasser beladen, eine Minute bei RT inkubiert und abschließend eine Minute zentrifugiert. Der RNA-Gehalt und die Reinheit wurden mittels Nanodrop (Thermo Scientific Fischer, Wilmington, USA) ermittelt, die Proben mit Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die jeweiligen Arbeitsschritte sind in **Tab. 3.4** zusammengefasst.

Arbeitsschritt	Inkubationsdauer
1. Homogenisieren	30 s
2. Trizol inkubieren	5 min
3. Chloroform zugeben	3 min
4. Phasentrennung	15 min
5. Ethanol zugeben	-
6. Säule beladen	-
7. 1 x Waschenpuffer I	-
8. 2 x Waschpuffer II	-
9. Säule trocknen	1 min
10. Eluieren	1 min

Tab. 3.4: Arbeitsschritte für RNA-Isolierung

Die Durchführung des Microarrays wurde von der Microarray Facility in Leuven (Belgien) übernehmen. Benutzt wurde ein Affymetrix GeneChip[®] nach Angaben des Herstellers. Die bioinformatische Auswertung wurde von Dr. Emiel Ver Loren van TheMaat (Academic Medical Center Amsterdam) vorgenommen.

4.4 Histologische Methoden

Um eventuelle morphologische Änderungen im Gehirn von ko-Mäusen festzustellen, wurde das Gewebe fixiert, geschnitten und anschließend immunhistologisch gefärbt. Bei der hier angewendeten Technik schwammen die Schnitte frei in den jeweiligen Lösungen (*free floating*) (Donarum et al. 2006). Im Gegensatz dazu wurden Schnitte des Sehnervs direkt nach dem Schneiden auf Deckgläser (SuperFrost[®] Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen, eine Stunde luftgetrocknet und dann bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

4.4.1 Fixierung des Gewebes

Die Fixierung des Gewebes erfolgte in Kooperation mit Prof. Karin Gorgas (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Heidelberg). Zur vergleichenden Analyse wurden stets männliche gleichaltrige Tiere (je eine PL-defizientes und eine Kontrolle) aus demselben Wurf gewählt. Die Tiere wurden durch eine peritoneale Injektion von Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (9 mg/kg) betäubt. Die Perfusion erfolgte über den linken Ventrikel. Zunächst wurde mit 2% Polyvinylpyrrolidon (PVP) / 0,2% Procainhydrochlorid in physiologischer Kochsalzlösung für wenige Sekunden gespült und nachfolgend 30 Minuten mit 4% Paraformaldehyd (PFA), 2% PVP in 0,1 M Phosphatpuffer (Volumen ca. 500 ml). Das so fixierte Tier wurde in einzelne Gewebe zerteilt, die anschließend durch Saccharoselösungen mit ansteigender Konzentration (10%, 20%, 30% [w/v] in PBS-Fix) geführt wurden. Die Inkubationsdauer der ersten beiden Schritte betrug eine Stunde, der letzte Schritt erfolgte ÜN (Yoo et al., 1974). Abschließend wurden die einzelnen Gewebestücke in Kryomedium (Tissue-Tek[®], Sakura, Zoeterwoude) eingebettet.

PBS-Fix: 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,2)

tp

4.4.2 Free Floating Immunhistochemie

Für diese Arbeit wurden verschiedene Gewebe verwendet.

- Der rostrale Teil (vor Bregma -0,70 mm) einer Hemisphäre des Großhirns
- Mit- und Parasagittale Teile der cerebelaren Vermis
- Sehnerv (Arbeitsschritte und Lösungen entsprechen dieser Beschreibung, obwohl die Schnitte aufgezogen waren)

Die Schnitte mit einer Dicke von 20 µm wurden angefertigt an einem Kryostat (Leica CM3050 S, Nussloch) bei einer Kammertemperatur von -21°C und einer Objekttemperatur von -19°C und anschließend in PBS aufbewahrt.

Nach dreimaligen 10minütigem Waschen mit PBS erfolgte die Permeabilisierung des Gewebes mit 0,3% Triton X-100 in PBS mit 10% BSA zur gleichzeitigen Absättigung von

unspezifischen Bindungsstellen, gefolgt von einer Inkubation mit dem/den Primärantikörper/n (Verdünnung in Permeabilisierungslösung) ÜN bei 4°C. Anschließend wurde dreimal 10 Minuten mit PBS überschüssiger Antikörper weggewaschen und die Schnitte für vier Stunden mit entsprechendem/n Sekundärantikörper/n (Verdünnung in Permeabilisierungslösung) inkubiert. Nach abschließendem dreimaligen 10minütigem Waschen in PBS wurden die Schnitte auf Objektträger (SuperFrost® Plus) aufgezogen und mit Mowiol eingebettet. Die jeweiligen Arbeitsschritte sind **Tab. 3.5** zusammengefasst.

Die Auswertung erfolgte an einem Zeiss LSM 510 Konfokalmikroskop. Die Bildbearbeitung erfolgte in Adobe Photoshop CS2 und Canvas X (ACD Systems).

Arbeitsschritt	Lösung	Inkubationsdauer
1. 3 x Waschen	PBS	10 min
2. Permeabilisieren	0,3% Triton X-100, 10% BSA in PBS	1 h
3. Erstantikörper	0,3% Triton X-100, 10% BSA in PBS	ÜN bei 4°C
4. 3 x Waschen	PBS	10 min
5. Zweitantikörper	0,3% Triton X-100, 10% BSA in PBS	4 h
6. 3 x Waschen	PBS	10 min
7. Einbetten	Mowiol	10 min

Tab. 3.5: Arbeitsschritte für Free floating Immunhistochemie

Mowiol-Lösung:

- 6 g Glycerin
- 2,4 g Mowiol
- 6 ml ddH₂O
- 12 ml 0,2 M Tris/HCl (pH 8,5)

4.4.3 Verwendung zweier monoklonaler Mausantikörper

Die Methode, zwei monoklonale Mausantikörper in einer seriellen Immunofluoreszenz zu verwenden, beruht auf der Arbeit von Lewis Carl et al. (1993). Die ersten sechs Schritte sind analog zu der bereits beschriebenen Methode (Kapitel 1.4.2), wobei nur ein Primärantikörper eingesetzt wird. Nach dem Wegwaschen des überschüssigen Sekundärantikörpers erfolgt der erste Blockschrift mit einem beliebigen Antikörper aus der Maus, der frei Bindestellen des Sekundärantikörpers absättigen soll. Für diese Arbeit wurde ein α -Human Antikörper der Firma Dianova mit der Konzentration 50 $\mu\text{g/ml}$ (gelöst in PBS mit 1% BSA) eingesetzt. Nach zweistündiger Inkubation und dreimaligen waschen in PBS wurde ein zweiter Blockschrift mit α -Maus F(ab)-Fragmenten ebenfalls von der Firma Dianova ausgeführt, um eventuell frei gebliebene Bindestellen für den zweiten Sekundärantikörper abzudecken (**Abb. 3.3**).

Nach den Blockschriften wurde der zweite Primärantikörper appliziert und die Prozedur wie unter Kapitel 1.4.2 beschrieben zu Ende geführt.

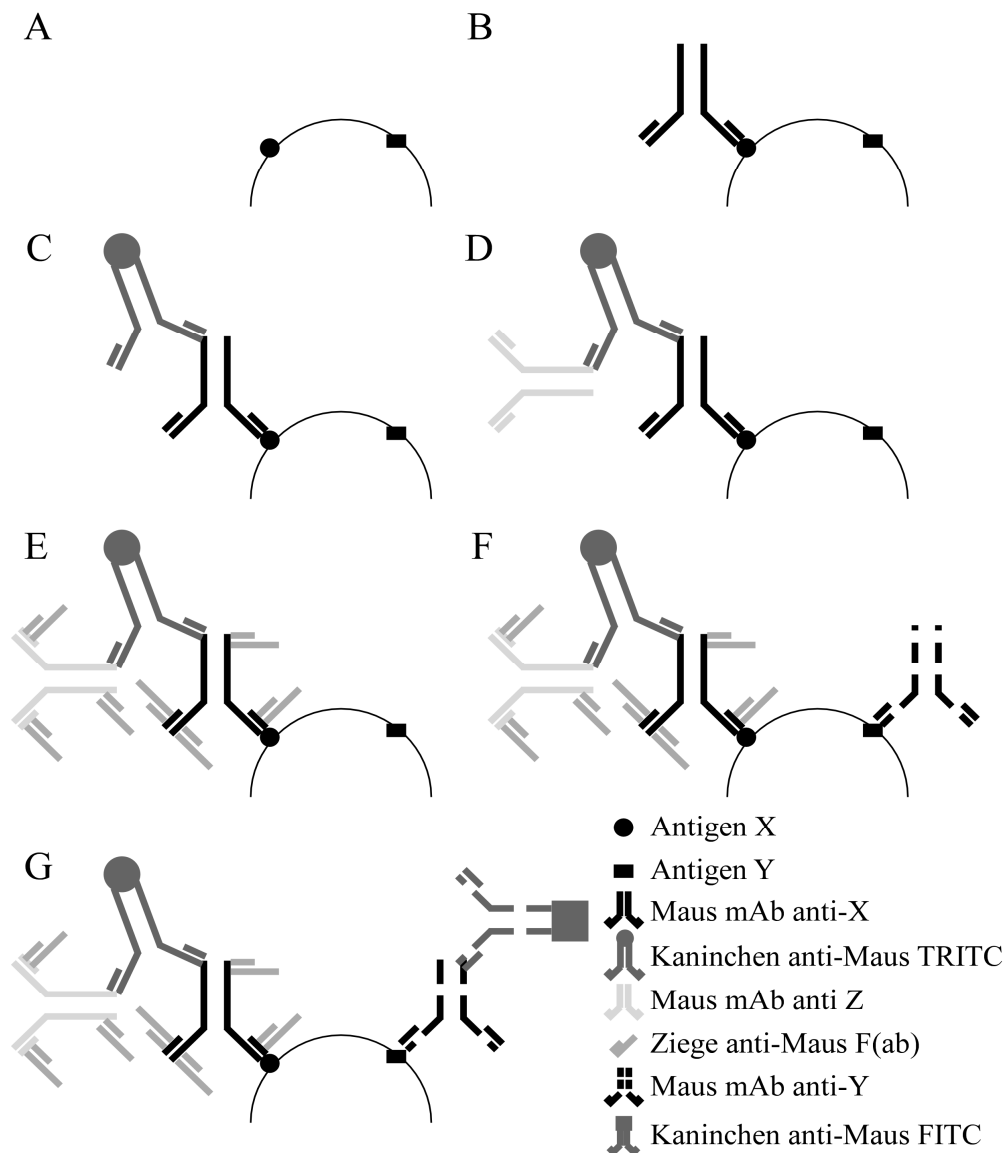


Abb. 3.3: Schema einer Immunfluoreszenz mit zwei monoklonalen Mausantikörpern. Um zwei verschiedene Epitope X und Y (A) anzufärben, wird zunächst eine normale Immunfluoreszenz mit einem Primärantikörper gegen X und einen Sekundärantikörper mit entsprechender Spezifität und Markierung durchgeführt (B, C). Durch zwei Blockschritte mit einem beliebigen monoklonalen Antikörper aus der Maus, der alle freien Bindungsstellen des ersten Sekundärantikörpers abdeckt (D), und einem anti-Maus F(ab)-Fragment, das alle übrigen Mausantikörperbindestellen absättigt (E), wird erreicht, dass eine zweite Immunfluoreszenz mit einem monoklonalem Mausantikörper durchgeführt werden kann (F, G).

4.4.4 Semidünnschnitte und Elektronenmikroskopie

Für Semidünnschnitte und Elektronenmikroskopie des Kleinhirns wurden die Tiere nach Betäubung mit 2,5% Glutaraldehyd, 2% PVP und 0,05% CaCl_2 in 0,1 M Na-Cacodylatepuffer, pH 7,6 transkardial perfundiert und folgend 60-150 μm dicke mit- und parasagittale Schnitte der cerebelaren Vermis mit Hilfe eines Dosaka DTK-1000 angefertigt. Die Schnitte wurden in 1,5% reduziertem OsO_4 für 30 Minuten nachfixiert gefolgt von einer Stunde Inkubation mit 1,5% OsO_4 in Na-Cacodylatepuffer und en bloc Färbung mit 1% Uranylacetat für 30 Minuten. Nach der Dehydration in aufsteigenden Ethanolkonzentration wurden die Proben in Epon unter Zuhilfenahme von Aclar Streifen eingebettet. Semidünnschnitte wurden mit einer modifizierten Richardson Methylenblau-Azur II Lösung gefärbt, während Ultradünnschnitte mit Bleicitrat gefärbt und mit einem Zeiss EM 906E Elektronenmikroskop analysiert wurden.

4.4.5 Immunhistochemie für Semi- und Ultradünnschnitte

Immunhistochemische Studien des Kleinhirns an Semi- und Ultradünnschnitten erforderte eine Modifikation des Protokolls. So wurde das Gewebe mit 4% PFA, 0,05% GA und 1% PVP in 0,1 M Na-Cacodylatepuffer, pH 7,6 für 20 Minuten transkardial perfundiert, gefolgt von 10 weiteren Minuten Perfusion mit 4% PFA und 2% PVP in Na-Cacodylatepuffer. Die Immunhistochemische Färbung erfolgte vor dem Einbetten, indem 50 μm dicke sagittale Microslicerschnitte der Vermis angefertigt und mit ansteigenden Saccharoselösungen (10%, 20%, 30% [w/v] und 2,3M mit 10% PVP) vor Gefrierschäden geschützt wurden. Diese Schnitte wurden in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan permeabilisiert und anschließend wieder durch die Saccharoselösungen in absteigender Reihenfolge geführt. Die permeabilisierten Gewebeschnitte wurden nun ÜN mit den Primärantikörper inkubiert, gefolgt von der Entwicklung der Färbung mit dem ABC-DAB-Kit (Vector Labs, Burlingame, USA) nach Angaben des Herstellers. Färbung mit OsO_4 und Einbetten in Epon verliefen wie in Kapitel 1.4.3 beschrieben.

4.4.6 In vivo Kalziumfärbung

Die hier beschriebene Methode der Kalziumfärbung in vivo mit anschließender Immunofluoreszenz von 250 µm dicken Schnitten des cerebralen Cortex beruht auf den Arbeiten von Strahlendorf et al. (1998), Hirase et al. (2004) und Beck et al. (2004).

Die Mäuse wurden kurz in Diethylether betäubt, dekapitiert und das Gehirn präpariert. Während der nächsten Schritte wurde das Gehirn konstant in 1-4°C kalter künstlicher cerebrospinaler Flüssigkeit (*artificial cerebrospinal fluid*, ACSF) aufbewahrt, die mit Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlenstoffdioxid) begast wurde. Nach Präparation des Kleinhirns wurde es mit Klebstoff (handelsüblicher Schnellkleber) auf einem Vibratom (Leica 1000S) befestigt und 250 µm dicke Schnitte angefertigt.

Nach einer Stunde Regenerationszeit in 37°C warmem und begastem ACSF wurden dem ACSF 2 µM Fluo4-AM (Invitrogen, Karlsruhe) und 0,3% (v/v) Pluronic acid F127 (BASF, Ludwigshafen) zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden die Schnitte mit frischem ACSF für 30 Minuten gewaschen. Die Fixierung erfolgte für 45 Minuten mit 40 mg/ml EDAC in PBS und anschließend eine halbe Stunde mit 4% PFA in PBS.

Die so fixierten Schnitte wurden nun wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben einer Immunofluoreszenz unterzogen und abschließend mit dem konfokalen Mikroskop ausgewertet.

ACSF:	124 mM NaCl
	3 mM KCl
	1,25 mM NaH ₂ PO ₄
	1,6 mM CaCl ₂
	1,8 mM MgSO ₄
	10 mM Glucose
	26 mM NaHCO ₃

4.4.7 Filipinfärbung

Zur Detektion von Cholesterin in Schnitten wurde Filipin, ein Sammelbegriff für alle vier polyenen Makrolide von *S. filipinensis*, verwendet, da es Cholesterin bindet und unter UV-Licht fluoresziert.

Der Ablauf der Färbung entspricht einer Immunofluoreszenz wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, nur dass der Permeabilisationsschritt durch eine dreistündige Inkubation mit 125 µg Filipin (Stock: 1 mg/ml in Dimethylsulfoxid [DMSO]) pro ml PBS mit anschließendem dreimaligen Waschen in PBS für 10 Minuten ersetzt wird. Zu beachten ist, dass die Proben möglichst lichtgeschützt gelagert werden.

Die Schnitte wurden mittels eines Leica TCS SP2 konfokalen Mikroskops, das mit einem Argon UV-Laser ausgestattet ist, am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg analysiert. Die Anregung erfolgte bei 352 nm, während das emittierte Licht mit einem Filter von 400-520 nm aufgenommen wurde.

5 Ergebnisse

Ausgehend von meiner Diplomarbeit „Myelinisierungsdefekte in Etherlipid-defizienten Mäusen“ (Teigler, 2006), in der eine Dysmyelinisierung im Kortex, einhergehend mit einer Reduktion der Leitungsgeschwindigkeit im Corpus callosum, von 45 Tage alten PL-defizienten Mäusen festgestellt wurde, war das Ziel dieser Doktorarbeit, diese Befunde zu bestätigen und zu vertiefen.

Dazu wurden weitere immunhistologische Färbungen im Kortex, Sehnerv und auch im Kleinhirn, das sich als besonders geeignetes Modell für neuronale Effekte von PL-Defizienz erwies, durchgeführt, deren Ergebnisse teilweise mittels Western Blot quantifiziert wurden.

Der weitere Teil beschäftigt sich mit den Auswirkungen der PL-Defizienz auf den oxidativen Status verschiedener Organe, wobei das Hauptaugenmerk auch hier auf dem zentralen Nervensystem (ZNS) liegt.

5.1 Defekte in der Entwicklung des ZNS

Bei den eingehenden Untersuchungen des Kortex und vor allem des Kleinhirns zeigten sich mehrere Defekte: Dysmyelinisierung, axonale Schwellungen, Veränderungen im paranodalen Bereich und allgemeine Verzögerungen bei der Entwicklung des ZNS.

5.1.1 Foliationsmuster und Körnerzellenmigration

Bereits 10 Tage nach der Geburt (P10) zeigen sich im Foliationsmuster des Kleinhirns Änderungen bei PL-defizienten Tieren im Vergleich zu Kontrollen (**Abb. 4.1**). Normalerweise besteht das Kleinhirn einer C57B/6 Maus aus zehn Folien. Während die Fissuren, die die Hauptfolien abgrenzen, normal ausgebildet zu sein scheinen, sind die interkulminat, deklivial und uvular Fissuren in PL-defizienten Tieren, die die Folien IV und V, VI und VII, sowie IX und X trennen, nur rudimentär bis gar nicht angelegt. Beobachtungen dieser Art sind von P10 bis P45 gemacht worden, sind aber bei anderen immunhistochemischen Versuchen noch bis ins hohe Alter gesehen worden.

Aufnahmen von Semidünnschnitten aus dem Bereich zwischen Folie VI und VII bei P20 zeigen bei PL-defizienten Tieren auch eine deutlich reduzierte Tiefe der Fissur, sowie Reste der externen Körnerschicht mit einigen Vorläuferzellen für Körnerzellen, die bei entsprechenden Kontrolltieren schon in die interne Körnerschicht gewandert sind. Dieser Befund dokumentiert eine allgemeine Verzögerung in der Entwicklung des Kleinhirns.

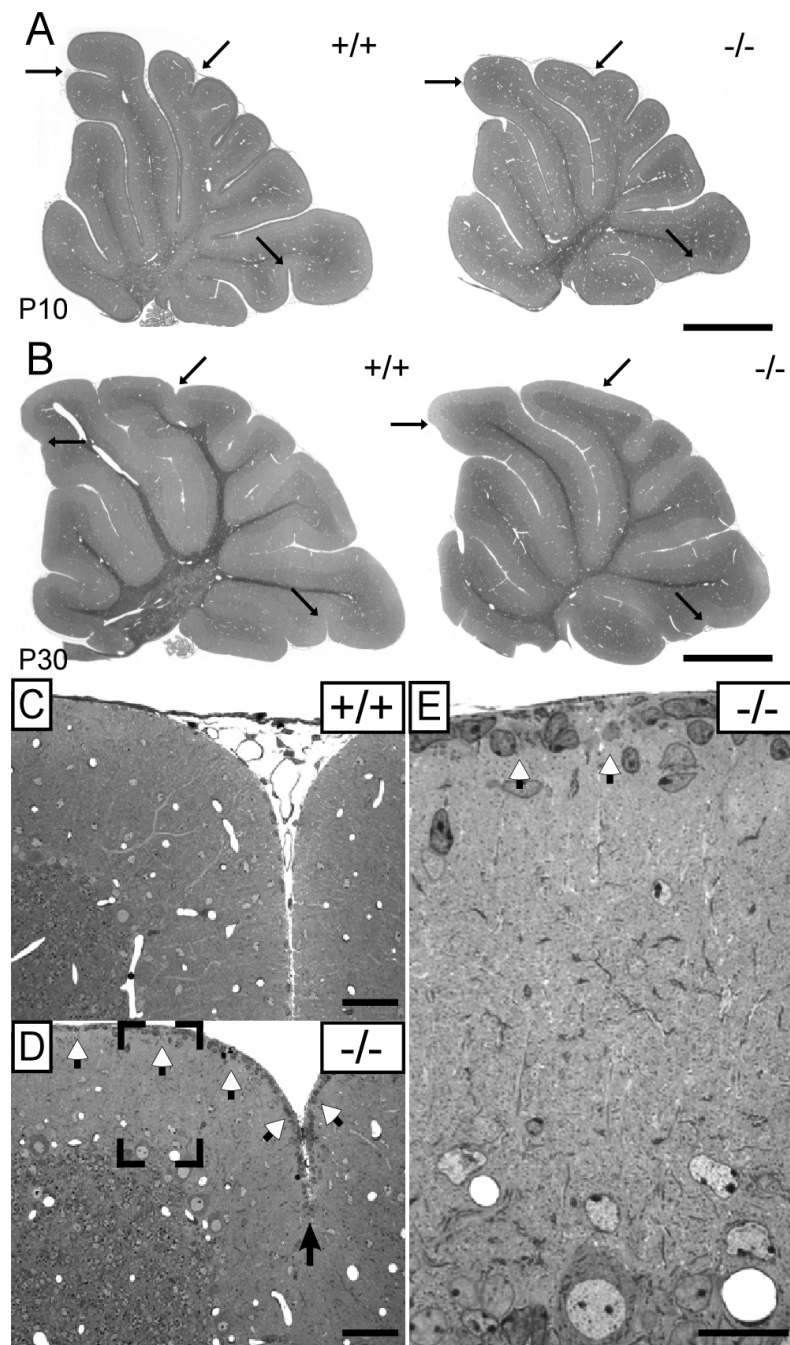


Abb. 4.1: Änderungen im Foliationsmuster (A, B) und Verzögerung in der Körnerzellvorläuferwanderung (C-E) bei Kontrollen (+/+, C) und PL-defizienten Tieren (-/-, D, E) im Kleinhirn bei P10 (A), P30 (B) und P20 (C, D, E). Schwarze Pfeile markieren die bei PL-defizienten Tieren nur schwach entwickelten Fissuren (A, B, D), während weiße Pfeile die Reste der externen Körnerzellschicht in PL-defizienten Tieren (D, E) anzeigen.

Messbalken repräsentieren 1 mm (A, B), 50 μ m (C, D) und 25 μ m (E).

5.1.2 Myelinisierung

Schon in früheren Arbeiten (Rodemer et al., 2003) und in meiner Diplomarbeit wurden Defekte in der Myelinisierung des Nervus opticus und des cerebralen Kortex von PL-defizienten Tieren festgestellt. Es zeigt sich, dass auch das Kleinhirn von diesem Defekt betroffen ist (**Abb. 4.2**). Der Effekt scheint sowohl im Kortex als auch Kleinhirn bis ins hohe Alter der Tiere zu bestehen, ist also keine Verzögerung der Myelinisierung, die zu einem späteren Zeitpunkt Normalmaß erreicht, sondern ein bleibender Defekt. Exemplarisch werden hier Bilder (**Abb. 4.3**) von MBP-gefärbten Kortizes bei P20 und von 8 Monate alten Tieren gezeigt. Zu sehen ist deutlich, dass der äußere Kortex bei PL-defizienten Tieren kaum bis gar nicht myelinisiert ist und auch das Netzwerk an myelinisierten Axonen weniger dicht erscheint.

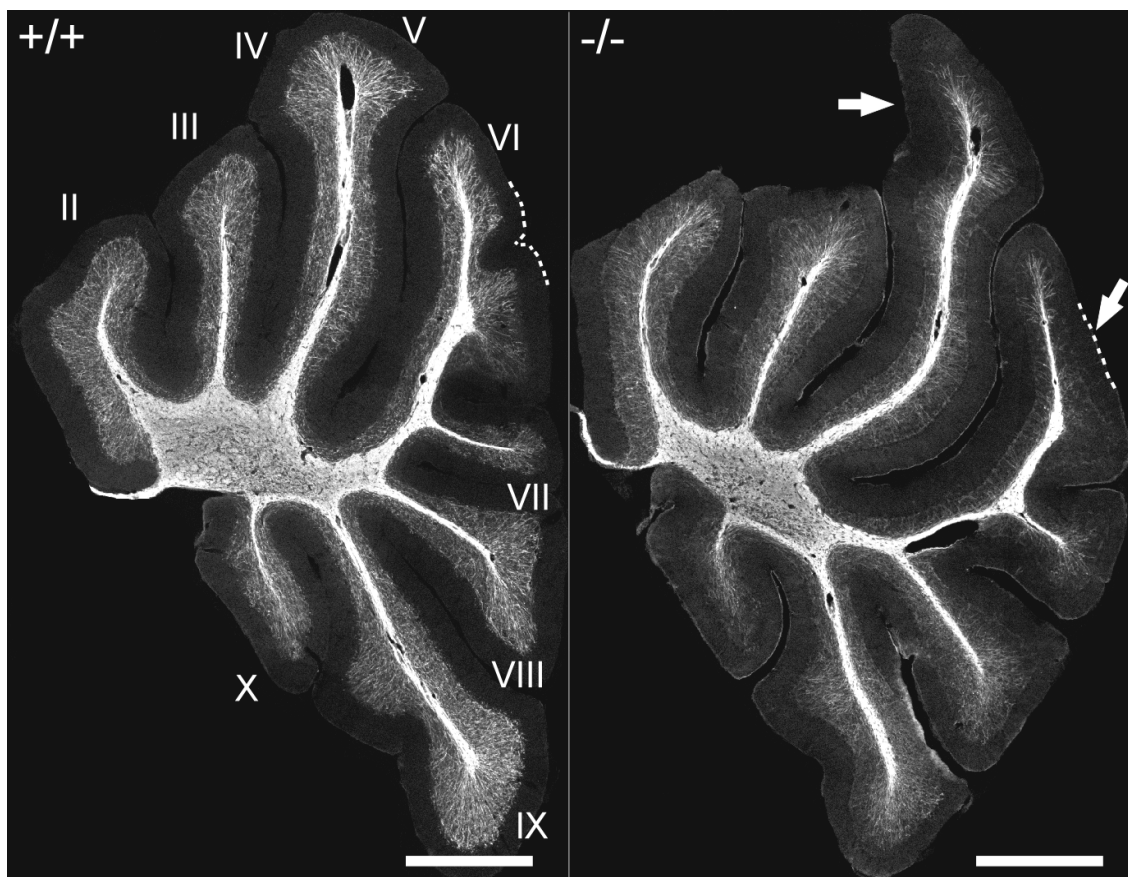


Abb. 4.2: Foliationsmuster und Myelinisierung des Kleinhirns bei P20 von einem Kontroll- (+/+) und einem PL-defizienten Tier (-/-). Die immunhistochemische Färbung von MBP zeigt den Grad der Myelinisierung, römische Nummern kennzeichnen die einzelnen Folien, Pfeile markieren die deutlichsten morphologischen Unterschiede. Der Knockout zeigt eine deutliche Reduktion des Myelins, vor allem in Folie VI. Insgesamt wurden je 6 Paare analysiert. Der Messbalken repräsentiert 1 mm.

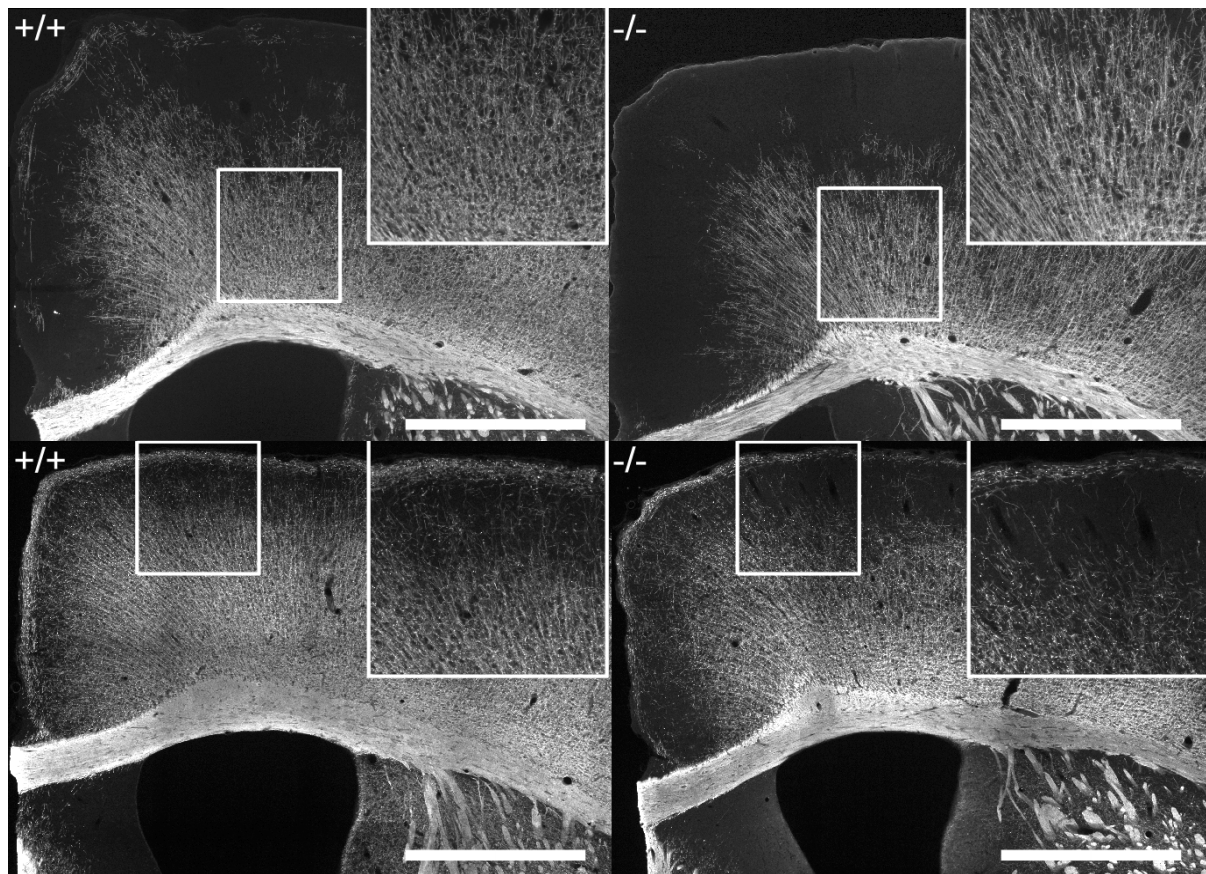


Abb. 4.3: Dysmyelinisierung und Reduktion der Netzwerkichte im Kortex von PL-defizienten Tieren (-/-) im Vergleich zu Kontrolltieren (+/+). Der obere Hälfte zeigt 20 μ m dicke Schnitte aus dem Bregma-Bereich -0,5 mm bis 0,5 mm bei P20, während die untere Hälfte vergleichbare Schnitte von acht Monate alten Tieren darstellt. In allen Schnitten wurde MBP immunhistochemisch angefärbt. Deutlich ist in allen Bildern zu erkennen, dass der äußere Bereich des Kortex bei PL-defizienten Tieren weniger stark myelinisiert ist. Auch nach acht Monaten ist der äußerste Bereich nicht myelinisiert (Insets bei den unteren Bildern). Das Netzwerk der myelinisierten Axone direkt über dem Corpus callosum erscheint weniger dicht (Insets der oberen Bilder). Der Messbalken repräsentiert 400 μ m.

Färbungen gegen den Marker NeuN, der in den Nuklei der meisten Neuronen aufzufinden ist, belegen, dass im äußeren, nicht-myelinisierten Bereich der Knockouttiere dennoch kein Unterschied in der Neuronenzahl zu sehen ist (**Abb. 4.4**).

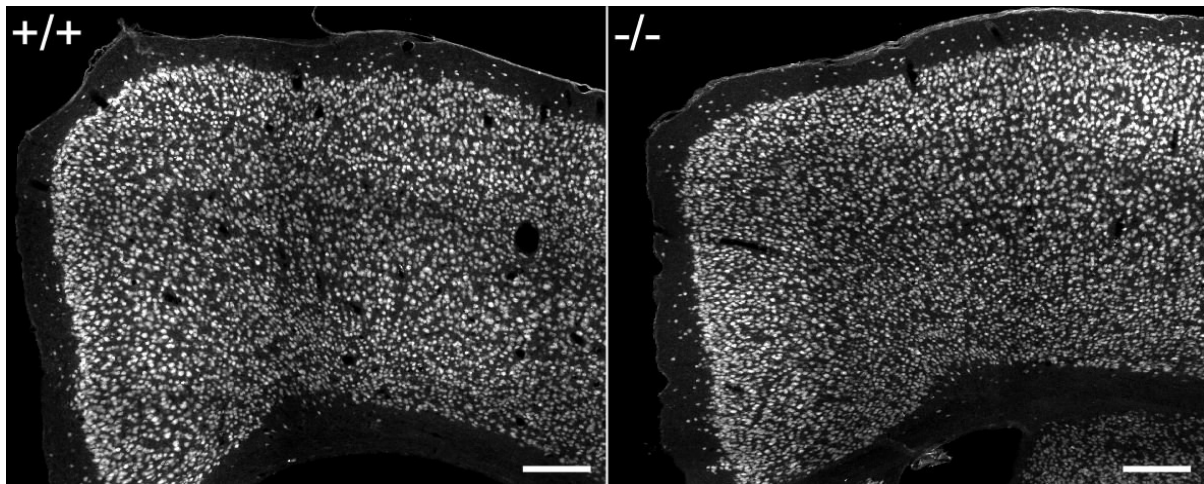


Abb. 4.4: Neuronendichte im Kortex von PL-defizienten Tieren (-/-) im Vergleich zu Kontrolltieren (+/+) bei P20. Angefärbt ist der neuronale Nukleimarker NeuN. Deutlich zu sehen ist, dass der Bereich der in Abb. 4.3 nicht myelinisiert ist, dennoch nicht weniger Neuronen enthält. Der Messbalken repräsentiert 400 μm .

Ein genauerer Blick ins Kleinhirn zeigt, dass dort zwischen P20 und P45 noch deutliche Unterschiede in der Myelinisierung bestehen (**Abb. 4.5**). In der Folie VI ist bei P20 eine sehr deutliche Differenz zwischen Kontrolle und Knockout zu sehen. Während in der Kontrolle die Myelinisierung schon fast die mit Calbindin-gefärbten Purkinjzellesomata erreicht, ist in der PL-defizienten Maus kaum Myelin außerhalb der medullären Schicht zu sehen. Bei P45 ist der qualitative Unterschied sichtlich kleiner geworden, allerdings reicht bei PL-defizienten Tieren das Myelin kaum bis in die Purkinjzellschicht hinein.

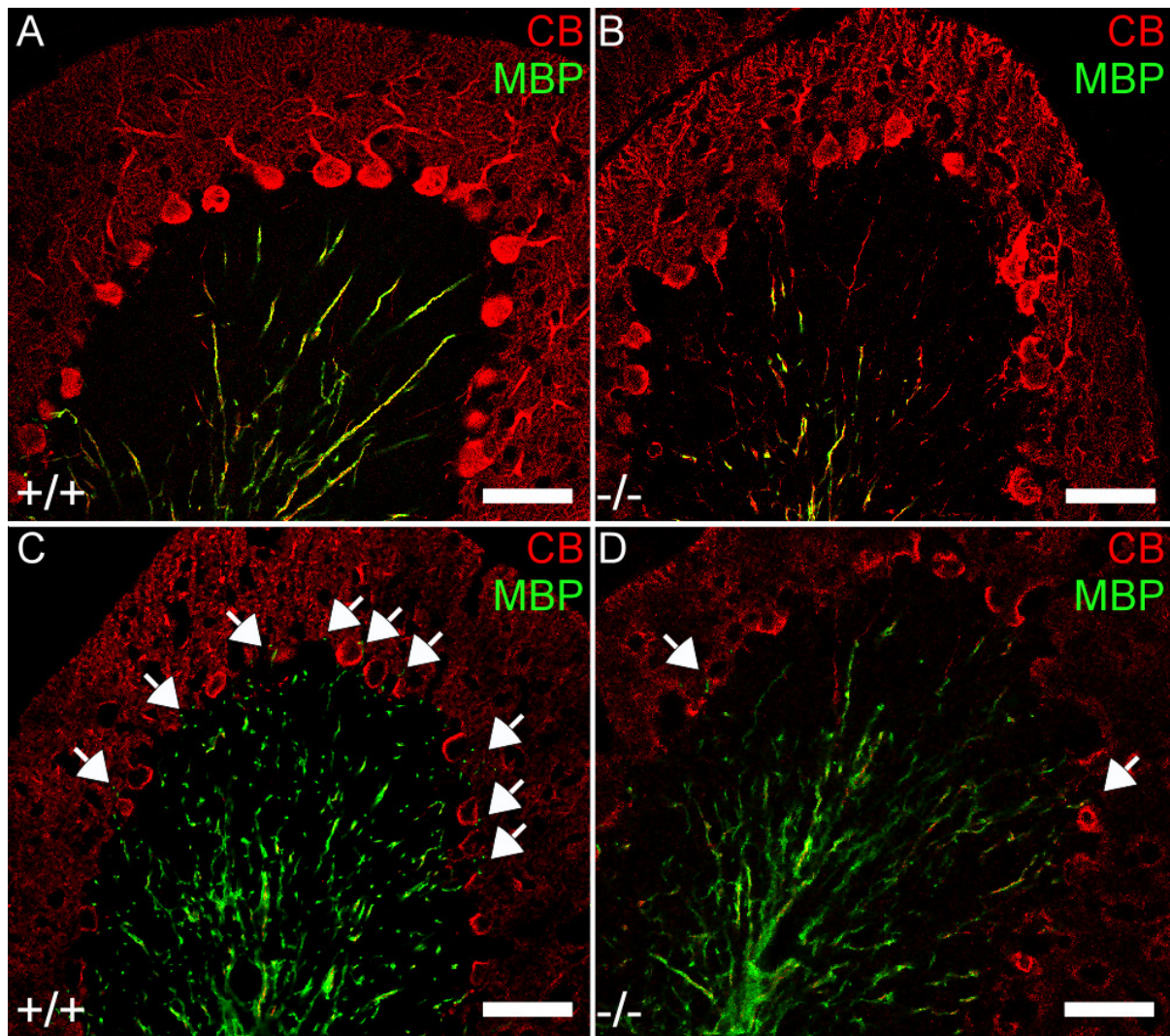


Abb. 4.5: Dysmyelinisierung von Purkinjellaxonen in PL-defizienten (-/-) und entsprechenden Kontrolltieren (+/+) in sagittalen cerebellaren Schnitten (20 μm dick) bei P20 (A, B) und P45 (C, D). Die Purkinjellen wurden mit Calbindin (rot) gefärbt, während Myelin mit MBP (grün) gefärbt wurde. Der nicht-myelinisierte Bereich der Axone ist in PL-defizienten Tieren deutlich vergrößert. Pfeile markieren Stellen, an denen Myelin in der Purkinjellschicht zu sehen ist. Der Messbalken repräsentiert 50 μm .

Die Quantifizierung des Myelins mittels Western Blots gegen MBP bestätigt die in der Immunhistochemie gefundenen Ergebnisse (**Abb. 4.6**). Im Kleinhirn zeigt sich, dass die Reduktion von MBP um ca. 40% auch bei P45 noch genauso groß ist, wie bei P20, obwohl in der Immunofluoreszenz der Unterschied kleiner zu sein scheint. Im Kortex dagegen wurde eine ca. 60%ige Abnahme des MBP-Signals gemessen. Anzumerken ist, dass der Antikörper

fünf der sechs klassischen MBP-Isoformen erkennt, wodurch vier durch Massenspektrometrie bestätigt werden konnten (Boggs, 2006).

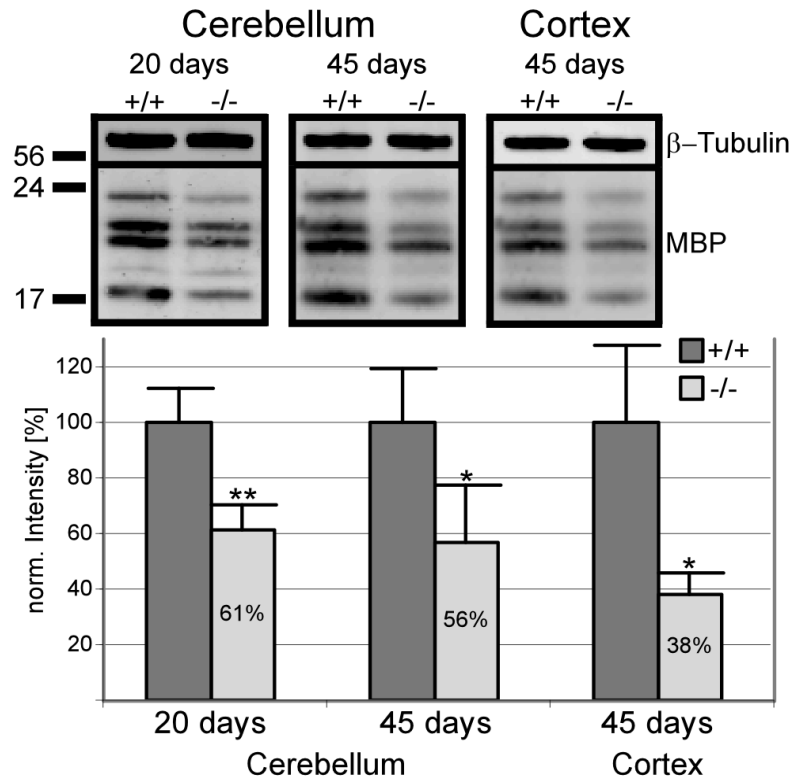


Abb. 4.6: Verringerte MBP-Konzentration im Kleinhirn (P20 und P45) und Kortex (P45) von Kontroll- (+/+) und DHAPAT-Knockout-Tieren (-/-) quantifiziert durch Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot gegen MBP. β -Tubulin diente als Ladekontrolle. Die densitometrische Auswertung der Blotsignale wurde mit Hilfe des Odyssey-Systems durchgeführt. Das Gewebe von jeweils vier Tieren wurde analysiert. Für die Statistik wurde der ungepaarte t-Test benutzt (** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$). Daten stehen für Mittelwert \pm Standardabweichung.

5.1.3 Änderungen im paranodalen Bereichs

Die folgenden Untersuchungen gingen von der Beobachtung aus, die Susuki et al. (2007) bei einem Gangliosid-defizienten Mausmodell gemacht haben. Ohne diese Lipide ist in ihrem Modell die räumliche Trennung zwischen den spannungsgesteuerten Kalium- und Natriumkanälen am Ranvierschen Schnürring durch den paranodalen Bereich nicht mehr gegeben. Beobachtungen an unserem Modell dagegen zeigten, dass die Kanäle zwar immer noch durch den paranodalen Bereich getrennt sind (**Abb. 4.7**), aber eine deutliche Verlängerung dieses paranodalen Bereiches zu erkennen ist (**Abb. 4.8**).

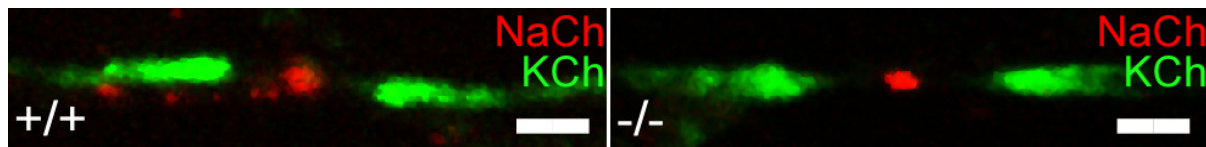


Abb. 4.7: Bei der räumlichen Trennung von Natriumkanälen (rot, NaCh) und Kaliumkanälen (grün, KCh) ist zwischen Kontrollen (+/+) und PL-defizienten Tieren (-/-) in der Immunofluoreszenz kein Unterschied feststellbar. Hier dargestellt ist jeweils ein Ranvierscher Schnürring aus dem Kleinhirn. Gleiche Beobachtungen wurden aber auch im Corpus callosum im Kortex und im Nervus opticus gemacht. Der Messbalken repräsentiert 2 μm .

Diese Verlängerung besteht sowohl im Nervus opticus, wo sie am deutlichsten ausfällt und die exemplarisch in **Abb. 4.8** dargestellt wird, als auch im Corpus callosum und im Kleinhirn.

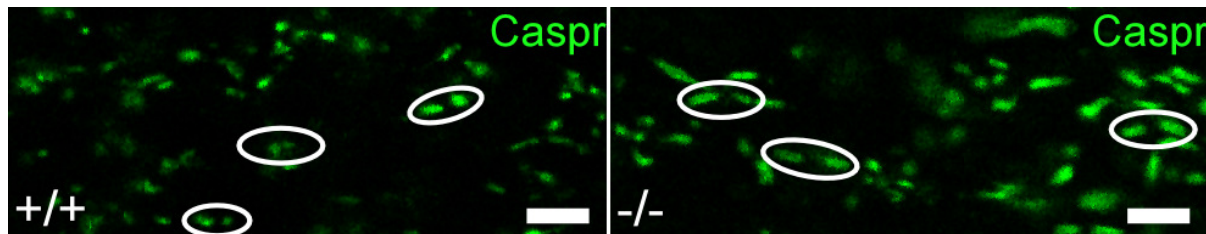


Abb. 4.8: Verlängerung des paranodalen Bereiches im Nervus opticus von 1 Jahr alten Kontrollen (+/+) und PL-defizienten Tieren (-/-). Gefärbt wurde das paranodale Protein Caspr. Einzelne Ranviersche Schnürringe wurden exemplarisch eingekreist. Der Messbalken repräsentiert 5 μm .

Eine quantitative Auswertung der paranodalen Bereiche aus allen drei Regionen des ZNS zeigt eine deutliche Elongation, aber keine vergleichbare Zunahme in der Axonbreite, d.h. das Verhältnis von Länge zu Breite wird größer. Verursacht wird diese Zunahme teilweise durch den größeren Anteil an sehr langen paranodalen Bereichen (größer als 2 μm) (**Abb. 4.9, Tab. 4.1**).

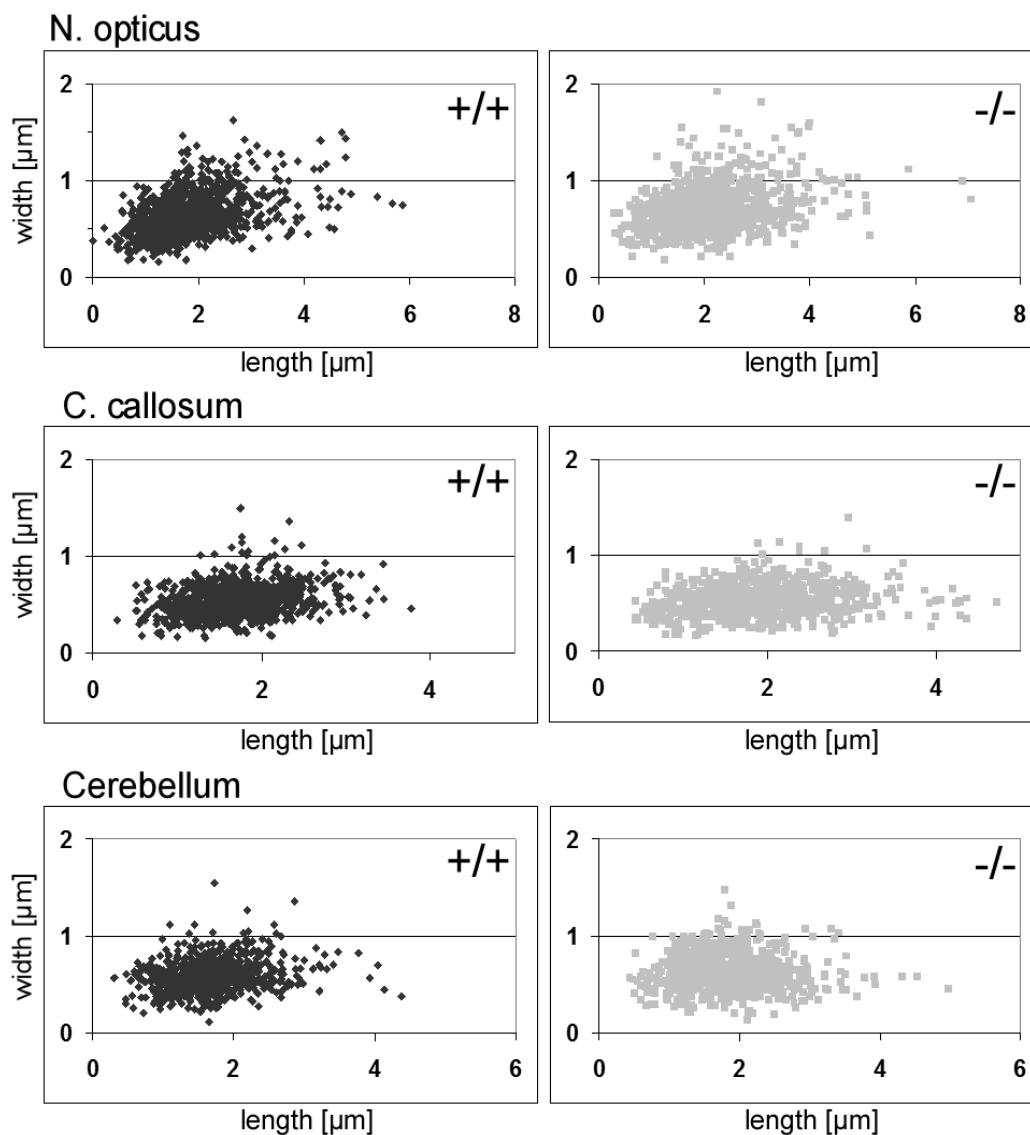


Abb. 4.9: Scatterplot der paranodalen Länge und Breite im Nervus opticus, Corpus callosum und Kleinhirn von Kontroll- (+/+) und DHAPAT-Knockout-Tieren (-/-). Die PL-defizienten Tiere zeigen eine Verlängerung aber keine deutliche Verbreiterung des Caspr-Signals.

Gewebe	Genotyp	Länge [μm]	Länge > 2μm	Breite [μm]	Verhältnis
N. opticus	wt	1,83	33,27%	0,64	3,00
	ko	2,12 ^{***}	50,73%	0,71 ^{***}	3,18 ^{***}
C. callosum	wt	1,68	23,85%	0,53	3,44
	ko	1,92 ^{***}	42,16%	0,54	3,83 ^{***}

Cerebellum	wt	1,71	24,58%	0,59	3,11
	ko	1,84 ^{***}	35,16%	0,61 ^{***}	3,33 ^{***}

Tab. 4.1: Dimensionen von Wildtyp (wt) und PL-defizienten (ko) paranodalen Bereichen im N. opticus, C. callosum und Kleinhirn. Gemessen wurden jeweils mehr als 700 paranodale Bereiche. Die statistische Auswertung erfolgte durch den ungepaarten t-Test ($p < 0,01$ ***).

Die Analyse der Verteilung des Kaliumkanalsignals im Verhältnis zum Caspr-Signal zeigt, dass mit der Verbreiterung des Caspr-Signals auch das Kaliumkanalsignal weiter vom Ranvierschen Schnürring entfernt beginnt, sich also bei einer Normalisierung der Länge keine Unterschiede in der Signalverteilung ergeben (**Abb. 4.10**).

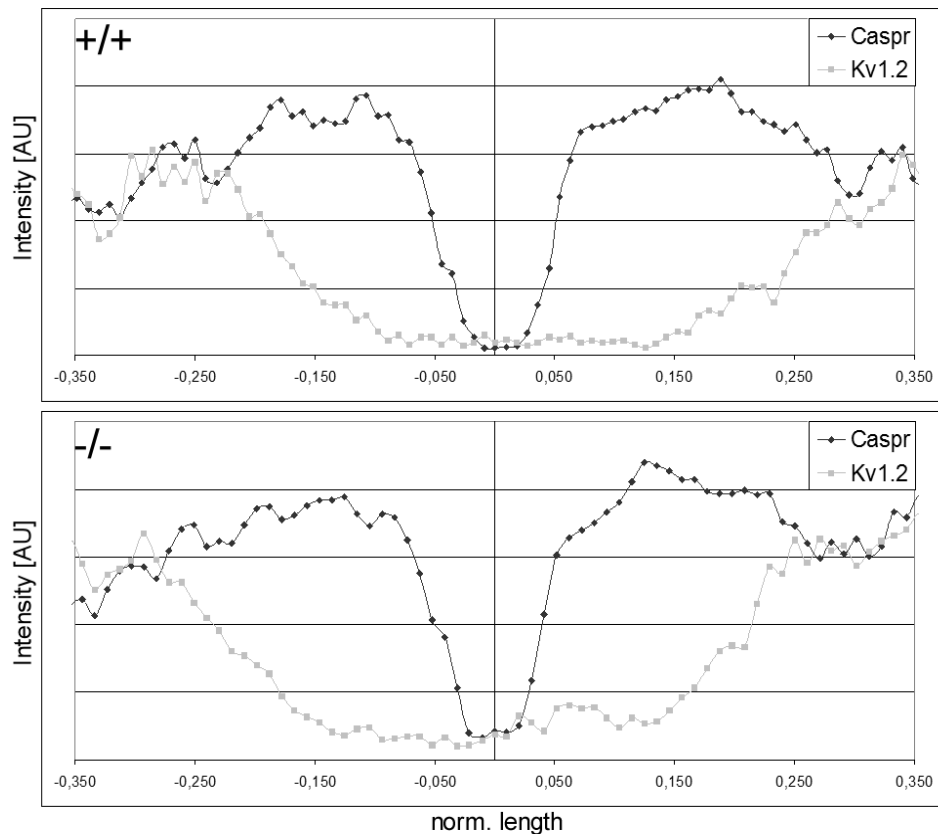


Abb. 4.10: Intensitätsverteilung des Caspr- und Kaliumkanalsignals (Kv1.2) auf die normalisierte Länge eines Ranvierschen Schnürrings inklusiver der paranodalen Bereiche im Nervus opticus von Kontroll- (+/+) und PL-defizienten Tieren (-/-). Die Verlängerung des Caspr-Signals hat keinen Einfluss auf den relativen Beginn (bezogen auf die Gesamtlänge des Caspr-Signals) des Kaliumkanalsignals. Gezeigt werden die Mittelwerte von mindestens zehn Ranvierschen Schnürringen. Ähnliche Ergebnisse sind im C. callosum und Cerebellum zu beobachten.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Kleinhirns zeigen in diesem Zusammenhang bei einigen Aufnahmen Veränderungen des Ranvierschen Schnürrings (**Abb. 4.11**). Anzumerken ist aber, dass dies keine generalisierten Effekte sind, sondern Einzelbeobachtungen. So fehlen bei einigen Schnürringen die transversen Banden der septate-like Junctions, die die terminalen Loops des Myelins mit dem Axon verbinden (**Abb. 4.11 A**), oder es sind Lücken im regelmäßigen Muster zu beobachten (**Abb. 4.11 B**).



Abb. 4.11: EM-Aufnahmen von Ranvierschen Schnürringen im Kleinhirn von PL-defizienten Tieren. (A) Die transversen Banden der Septate-like Junctions, bestehend aus Caspr, Contactin und Neurofascin 155 fehlen hier vollständig, während in (B) die Septate-like Junctions vorhanden sind (schwarze Pfeile) doch eine Bande fehlt (weißer Pfeil). Messbalken repräsentieren 100 nm.

5.1.4 Innervierung der Purkinjezelle

Bei immunhistochemischen Färbungen des Kleinhirns zeigte sich, dass Unterschiede in der Innervierung der Purkinjezellen zwischen Wildtyp und DHAPAT-Knockout-Tieren existieren.

Die von den Parallelfasern (PF) stammenden Synapsen sind bei normal entwickelten Mäusen in den oberen zwei Dritteln der Molekularschicht angesiedelt und das Verhältnis von prä- zu postsynaptischen Spines liegt im Bereich zwischen 1:1 oder 1:2. Bei PL-defizienten Tieren finden sich ungewöhnlich große, VGluT1-positive Synapsen direkt neben dem Zellsoma der Purkinjezellen. VGluT1 ist ein spezifischer Marker für PF. Auch die Purkinjezellen selbst zeigen Veränderungen. So sieht man am Zellsoma und am proximalen Dendritenbaum von PL-defizienten Tieren sehr viele Spines, die bei den entsprechenden Kontrollen nicht zu sehen sind (**Abb. 4.12**).

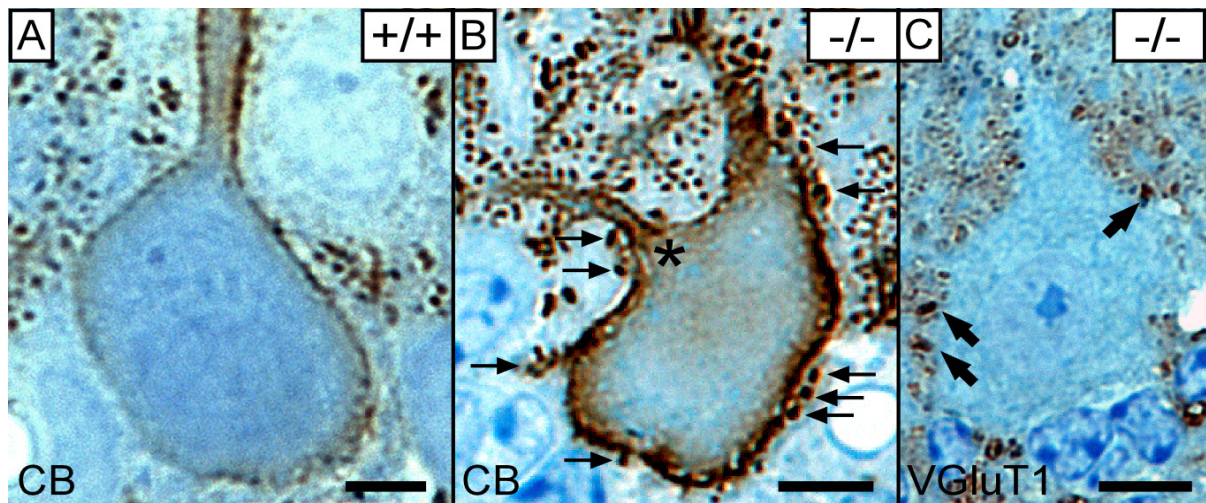


Abb. 4.12: Calbindin gefärbte Semidünnschnitte von Kontroll- (A, +/+) und PL-defizienten (B, -/-) Tieren. Deutlich zu sehen sind die zusätzlichen Spines am Zellkörper und proximalen Dendriten (schmale schwarze Pfeile). Der Stern markiert einen zusätzlichen Dendriten, ein Phänotyp der häufiger an Purkinjezellen von PL-defizienten Tieren zu beobachten ist. VGlut1-gefärbte Semidünnschnitte (C) zeigen ungewöhnlich große Synapsen (schwarzer Pfeil) direkt am Zellsoma von Purkinjezellen. Die Messbalken repräsentieren 10 μ m.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigen, dass sich am Zellsoma zahlreiche Spines befinden. Die ungewöhnlich großen PF-Synapsen erweisen sich im Elektronenmikroskop als Cluster von vier bis sechs postsynaptischen Spines der Purkinjezellen zusammen mit der Präsynapse einer Parallelfaser (**Abb. 4.13**). Der hier geschilderte Phänotyp wird auch „hyperspiny“ genannt und wurde erstmals von Sotelo (1990) beschrieben.

Auch die Innervierung durch die Kletterfasern (KF) ist im PL-defizienten Mausmodell verändert. In entsprechenden Kontrollen bilden die KF in den unteren 4/5 der Molekularschicht Synapsen zu den Purkinjezellen. Dabei bleiben das Zellsoma und der proximale Dendrit der Purkinjezellen frei von Synapsen. Nur während der Entwicklung des Kleinhirns, wenn die KF erstmals Kontakt zu Purkinjezellen herstellen und um sie konkurrieren, sind im Wildtyp Synapsen direkt am Zellsoma zu finden.

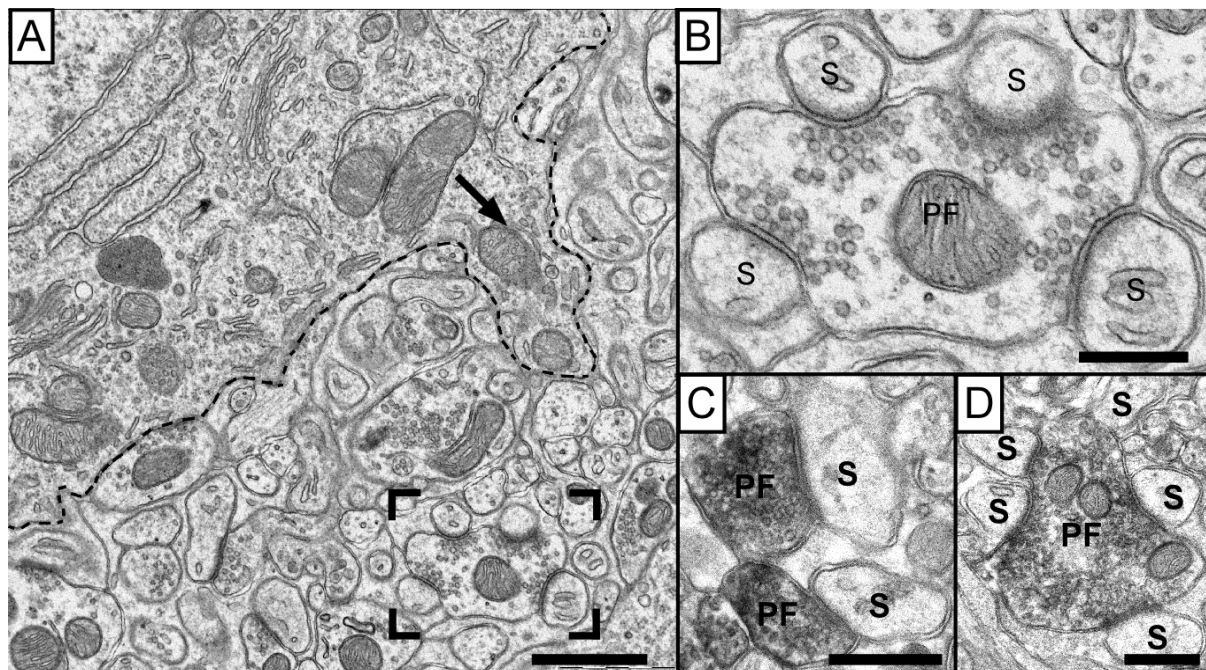


Abb. 4.13: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von PL-defizienten Tieren. In (A) ist das Zellsoma einer Purkinjezelle zu sehen (gestrichelte Linie). Der schwarze Pfeil markiert einen ungewöhnlichen Spine direkt am Zellkörper. Im markierten Bereich direkt neben der Purkinjezelle ist eine der ungewöhnlich großen PF-Synapsen zu sehen, die in (B) nochmals vergrößert dargestellt wird. Deutlich erkennbar ist die postsynaptische Dichte in den mit S gekennzeichneten postsynaptischen Spines und die Vesikel innerhalb der PF. Ein Vergleich der Vglut1 immunhistochemisch gefärbten Ultradünnschnitte sowohl von Kontrollen (C) sowie von PL-defizienten Tieren (D) zeigt, dass sich das Verhältnis von postsynaptischen Spines zu Präsynapsen von normalerweise 1:1 zu 1:4-6 verändert hat. Die Messbalken repräsentieren 1 μ m (A) und 500 nm (B-D).

Beobachtungen an mit Calbindin und VGluT2 (ein Marker für KF-Synapsen) gefärbten Schnitten zeigen aber, dass dieser eigentlich nur während der ersten 20-30 Tage vorliegende Stand der Synapsenbildung in PL-defizienten Tieren selbst nach einem Jahr noch vorliegt. Ähnlich wie bei der Myelinisierung zeigt sich hier eine Verzögerung in der Entwicklung, die zu keinem späteren Zeitpunkt wieder aufgeholt wird (**Abb. 4.14**).

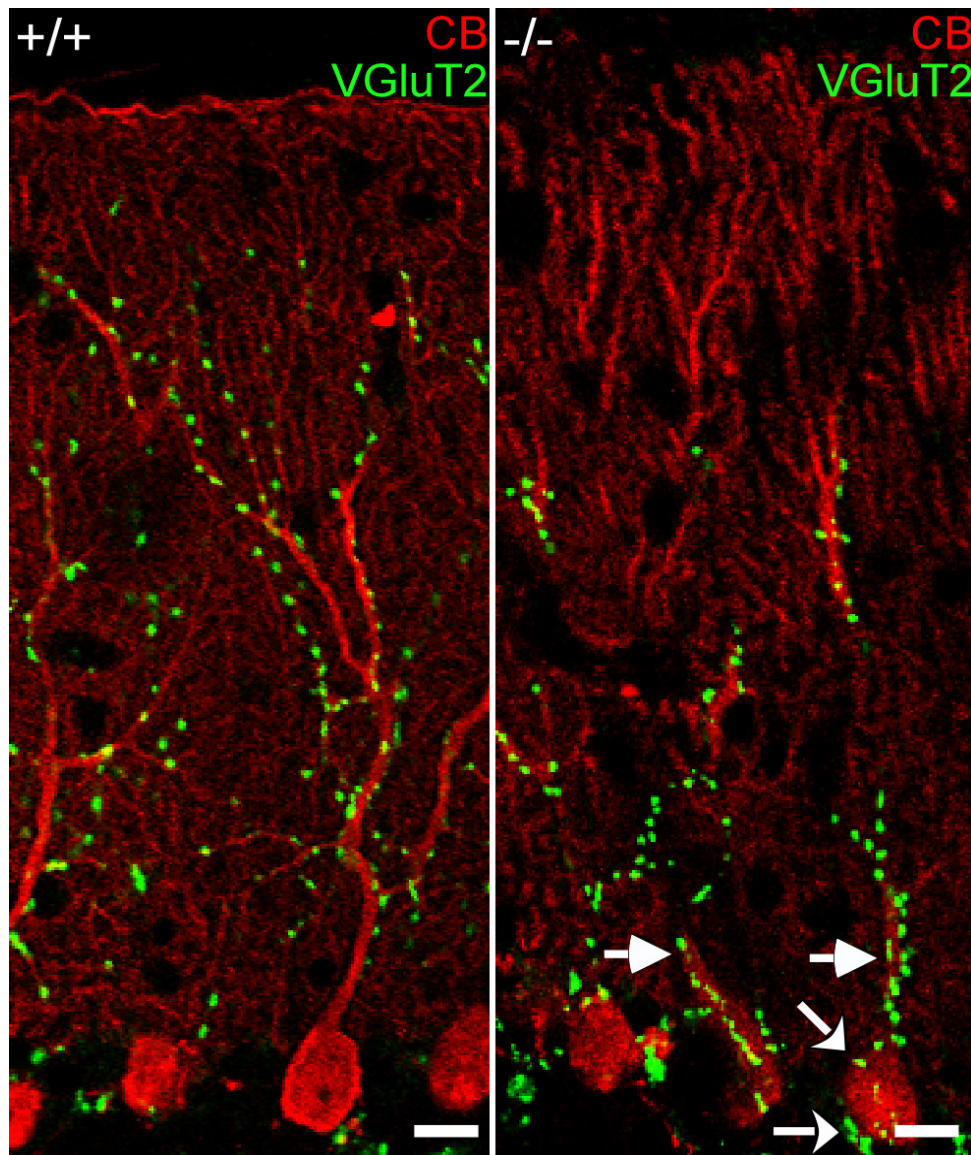


Abb. 4.13: Kletterfasersynapsenverteilung in der Folie VI von 1 Jahr alten Kontrollen (+/+) und PL-defizienten Tieren (-/-). In der Kontrolle sind in ca. 80% der Molekularschicht VGLuT2-Synapsen (grün; Purkinjezellen mit Calbindin gefärbt, rot) zu sehen, während im Knockout nur in zwei Dritteln der Molekularschicht Synapsen zu beobachten sind. Bemerkenswerterweise sind im Knockout auch noch nach einem Jahr Synapsen am Zellsoma (gerundete weiße Pfeile) und am proximalen Dendriten (gerade weiße Pfeile) zu sehen. Die Messbalken repräsentieren 10 µm.

5.1.5 Axonale Schwellungen im Kleinhirn

Bei Färbungen des Kleinhirns mit Calbindin zeigen sich in Schnitten von PL-defizienten Tieren große Schwellungen in den Axonen von Purkinjezellen. Weitere Experimente

dokumentieren, dass diese Schwellungen in jeder Folie des PL-defizienten Kleinhirns ab 15 Tagen nach der Geburt zu sehen sind.

Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigen, dass diese Schwellungen eine dicht gepackte Ansammlung membranöser, tubulärer Strukturen darstellen und dass diese häufig in der Nähe von Ranvierschen Schnürringen liegen (Abb. 4.14).

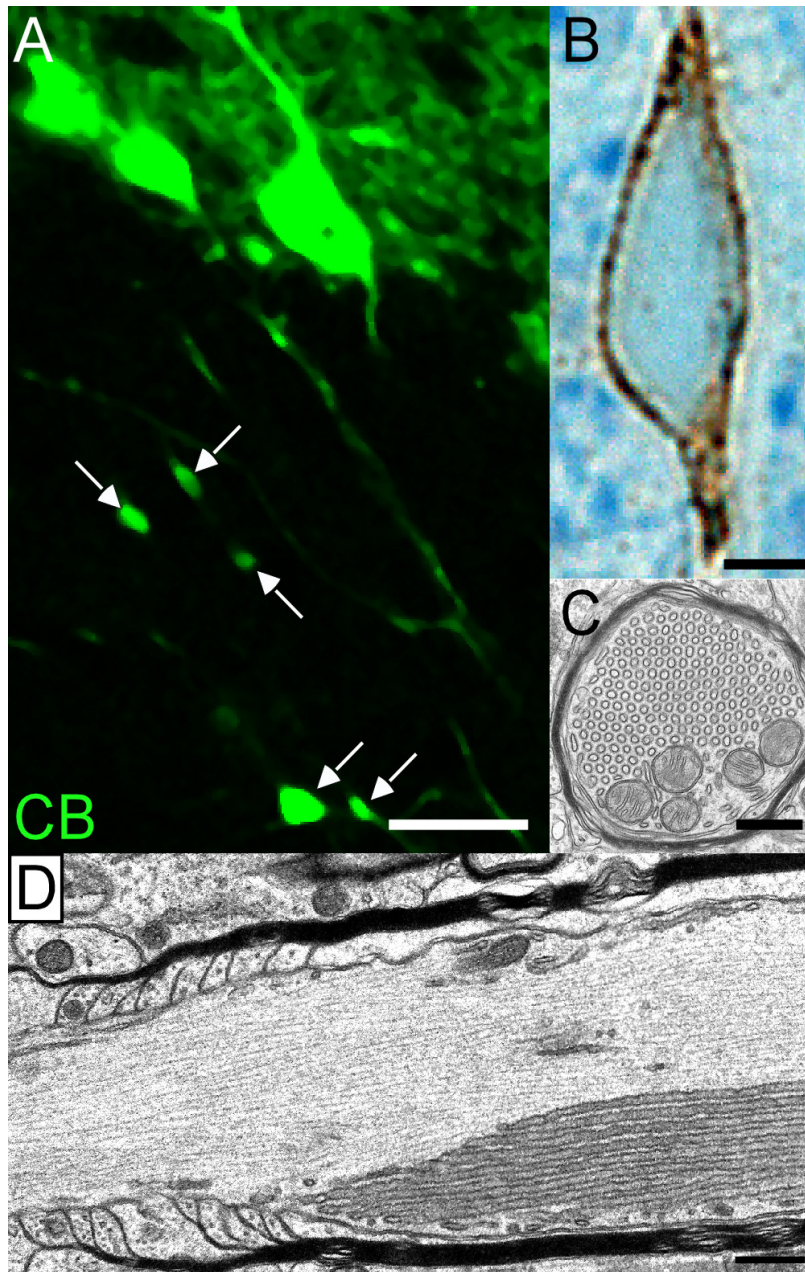


Abb. 4.14: Axonale Schwellungen in Purkinjezellen. In Calbindinfärbungen (A, B) von EL-defizienten Tieren sind in normalen und Semidünnschnitten axonale Schwellungen (weiße Pfeile) zu erkennen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen im Querschnitt (C) tubuläre hochgeordnete Membranstrukturen, während ein Längsschnitt (D) dokumentiert, dass diese Schwellungen öfters in der Nähe von Ranvierschen Schnürringen zu finden ist. Die Messbalken repräsentieren 20 μm (A), 2,5 μm (B) und 500 nm (C, D).

Bei höherer Auflösung sind weitere Details der Strukturen zu erkennen. So scheint die Membran von einem unscharfen Ring an elektronendichtem Material umgeben zu sein, der sich im Längsschnitt als köpfchenartige regelmäßige Proteinstruktur mit einem Abstand von ca. 10 nm darstellt. Intensive Kolokalisationsstudien mit Primärantikörpern gegen eine Vielzahl von zellulären Membranen (PDI, Calnexin, BiP, Rab5, EEA1, Clathrin, Cathepsin D, GM130, Cadherin, SNAP25, Synaptotagmin und α -Synuclein) ergaben keine positiven Signale für die jeweiligen Marker in den Schwellungen. Nur IP3R1, ein Marker für glattes endoplasmatisches Retikulum, konnte bisher in den Schwellungen lokalisiert werden (**Abb. 4.15**). IP3R1 selbst ist ein Kalziumkanal, der auf Signal (Inositoltrisphosphat) Kalzium aus dem ER freisetzt.

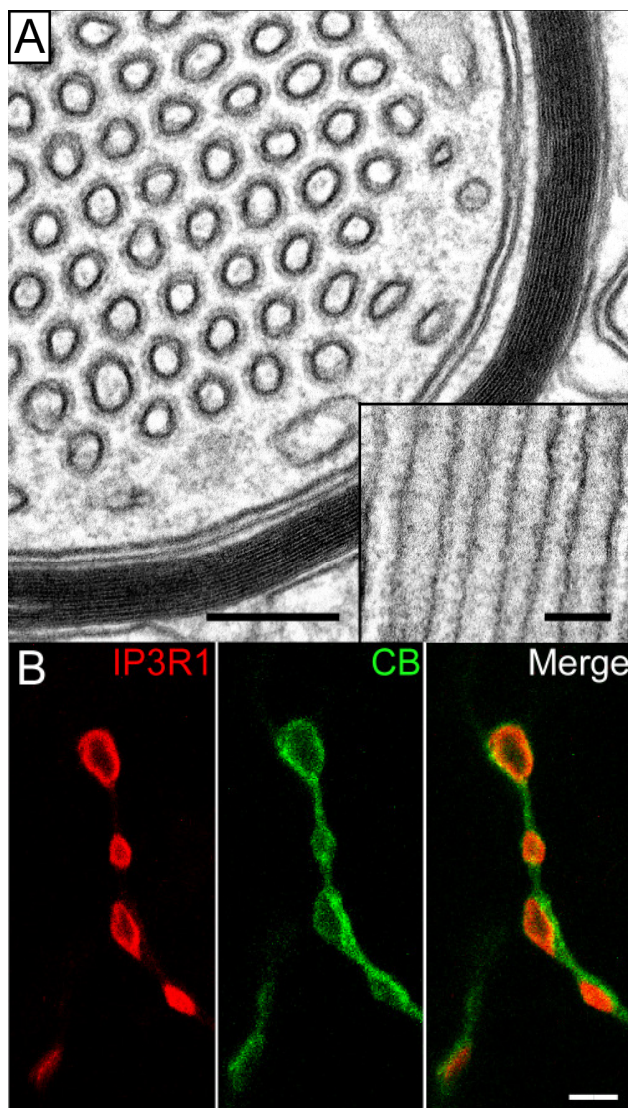


Abb. 4.15: IP3R1-enthaltende lamellare Stapel von ER-ähnlicher Membran. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen einen unscharfen Ring um die aufgenommene Struktur (A), der sich im Querschnitt als köpfchenartiger Proteinbesatz der Membran herausstellt. In Kolokalisationsstudien mit IP3R1 (rot) und Calbindin (grün) kann gezeigt werden, dass die Schwellungen vor allem IP3R1-positive Membran enthalten (B). Die Messbalken repräsentieren 200 nm (A), 100 nm (A, Inset) und 2 μ m (B).

Ähnliche Strukturen wurden auch im Zellsoma und im Dendriten sowohl von Kontrollen als auch DHAPAT-defizienten Tieren beobachtet, wobei die Ausmaße dort deutlich geringer sind (Abb. 4.16).

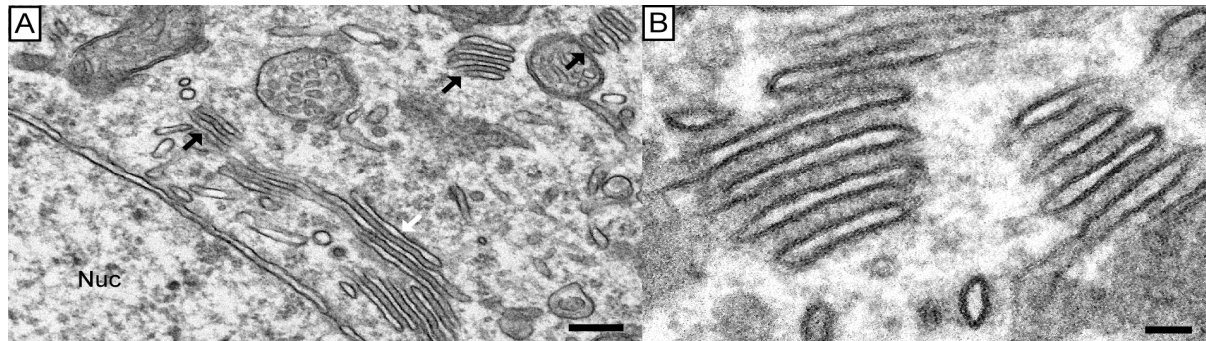


Abb. 4.16: ER-ähnliche Strukturen im Purkinjezellsoma. Strukturen, die den in den Schwellungen gefundenen Membranstapeln entsprechen, können auch im Zellsoma von Purkinjezellen gefunden werden (schwarze Pfeile; A, B). Zu bemerken ist, dass diese Stapel weitaus kleiner sind als in den Schwellungen. Nuc – Nukleus. Die Messbalken repräsentieren 250 nm (A) und 50 nm (B).

Die ersten Schwellungen in einem Axon sind dabei häufig am ersten Halbknotten dicht unterhalb des Purkinjezellkörpers zu finden, also dort wo die Myelinisierung des Axons beginnt (Abb. 4.17).

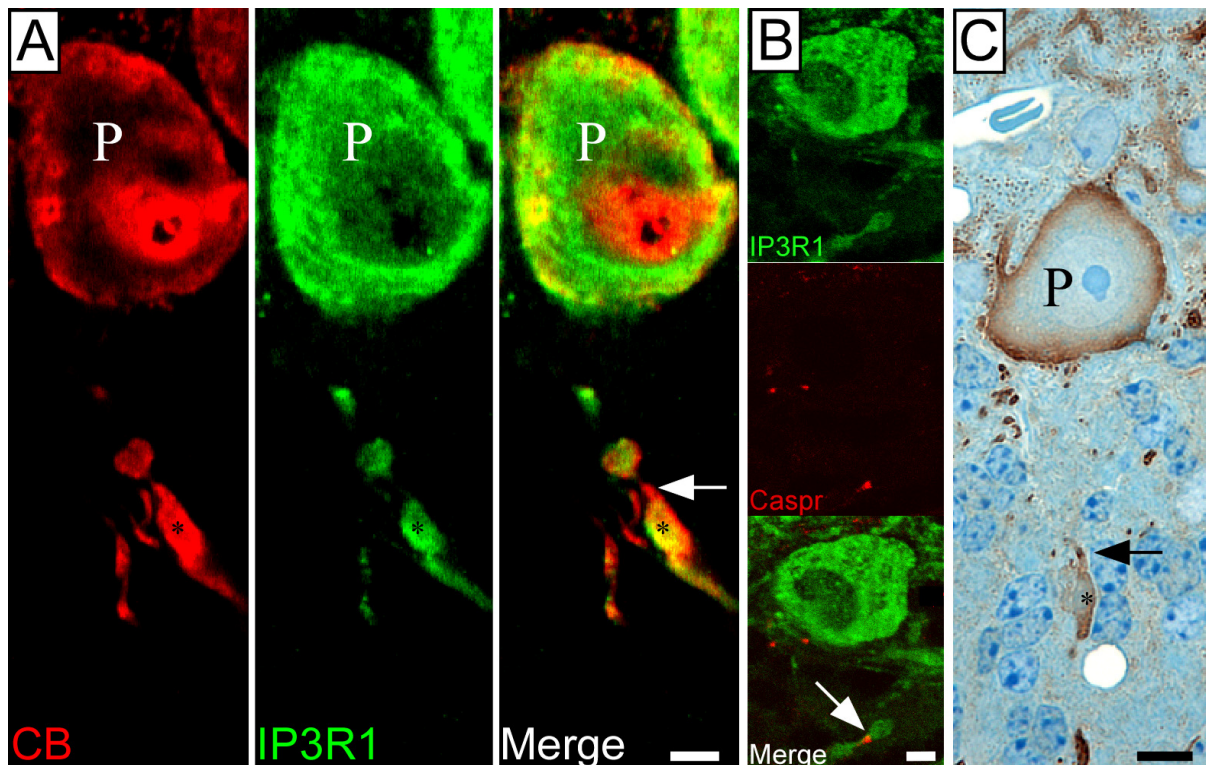


Abb. 4.17: Lokalisierung der ersten Schwellungen in den Purkinjezellaxonen. (A) Doppelimmunofluoreszenz mit Calbindin (CB, rot) und IP3R1 (grün). Zu sehen ist eine axonale Schwellung (Pfeile) direkt unterhalb der Purkinjezelle (P). So positionierte Schwellungen sind auch in Calbindin-gefärbten Semidünnschnitten (C) zu beobachten. Diese Position entspricht dem ersten Halbknoten, an dem die Myelinisierung des Axons beginnt. (B) Bestätigt wird diese Annahme durch eine Doppelimmunofluoreszenz mit IP3R1 (grün) und Caspr (rot). Die Pfeile markieren die Position des ersten Halbknotens. Die Messbalken repräsentieren 3 μm (A), 4 μm (B) und 10 μm (C).

Da IP3R1 eng mit der Kalziumdynamik vor allem in Purkinjezellen in Verbindung steht, wurde überprüft, ob die Schwellungen einen erhöhten Level an Kalzium aufweisen. Dazu wurde der Kalziumfarbstoff Fluo4-AM in Verbindung mit Immunofluoreszenz verwendet.

Diese Versuche zeigen, dass die Schwellungen keinen erhöhten Kalziumlevel aufweisen. Die neben der Schwellung liegenden Körnerzellen enthalten eine deutlich höhere Kalziumkonzentration (**Abb. 4.18**). Das meiste Kalzium sowohl in Kontrollen als auch EL-defizienten Schnitten findet sich im Zellsoma. Eine Kalziumfärbung in Verbindung mit Mitotracker demonstriert, dass das meiste Kalzium in Mitochondrien eingelagert ist (**Abb. 4.19**).

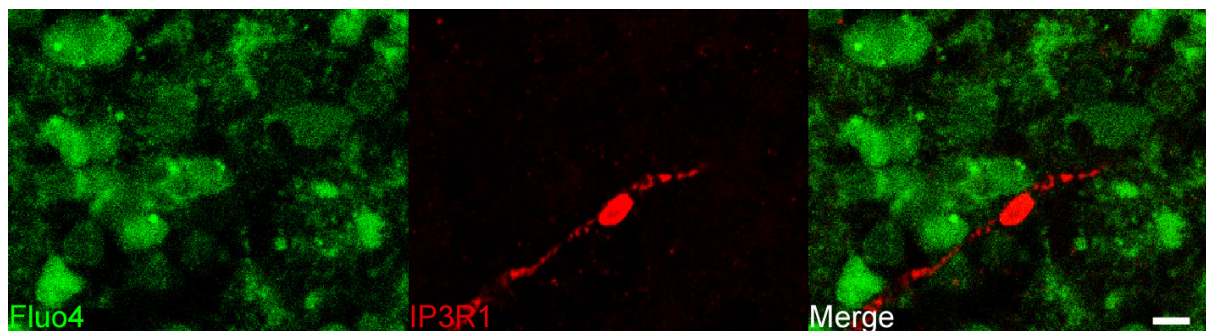


Abb. 4.18: Kalziumgehalt in axonalen Schwellungen von Purkinjezellen. Das mittels Fluo4 gefärbte Kalzium zeigt keine erhöhte Konzentration in den Schwellungen, die mittels IP3R1 sichtbar gemacht wurden. Der Messbalken repräsentiert 4 μm .

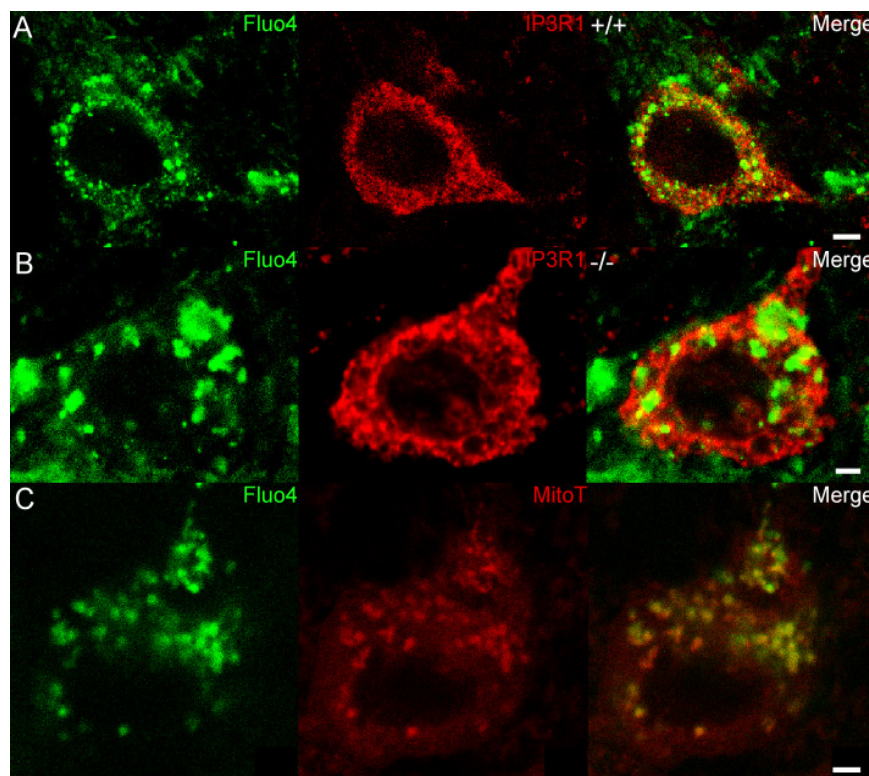


Abb. 4.19: Kalziumlokalisation in Purkinjezellen. Sowohl in Kontrollen (+/+, A) als auch in EL-defizienten Tieren (-/-, B) ist ein Großteil des Kalziums (grün) im Zellsoma zu sehen, kolokalisiert aber nicht mit dem IP3R1-Signal (rot). Eine Färbung mit Fluo4 und Mitotracker (MitoT, C, rot) zeigt, dass ein Großteil des Kalziums sich in den Mitochondrien befindet. Die Messbalken repräsentieren 4 μm (A) und 2 μm (B, C).

5.1.6 Cholesterin im Kleinhirn

Basierend auf den Ergebnissen meiner Diplomarbeit, in der verschiedene neuronale Zelltypen wie Astrozyten und Oligodendrozyten von DHAPAT-Knockout-Tieren ungewöhnliche Cholesterinakkumulationen zeigten, wurde untersucht, ob diese Akkumulation auch in den Zellen des Kleinhirns zu sehen ist.

Die Färbung mit Filipin und anschließende Immunofluoreszenz mit Calbindin lassen erkennen, dass der in der Zellkultur beobachtete Phänotyp nicht im Kleinhirn zu sehen ist. Der Vergleich mit den entsprechenden Kontrollen demonstriert die Übereinstimmung der Cholesterinverteilung (**Abb. 4.20**).

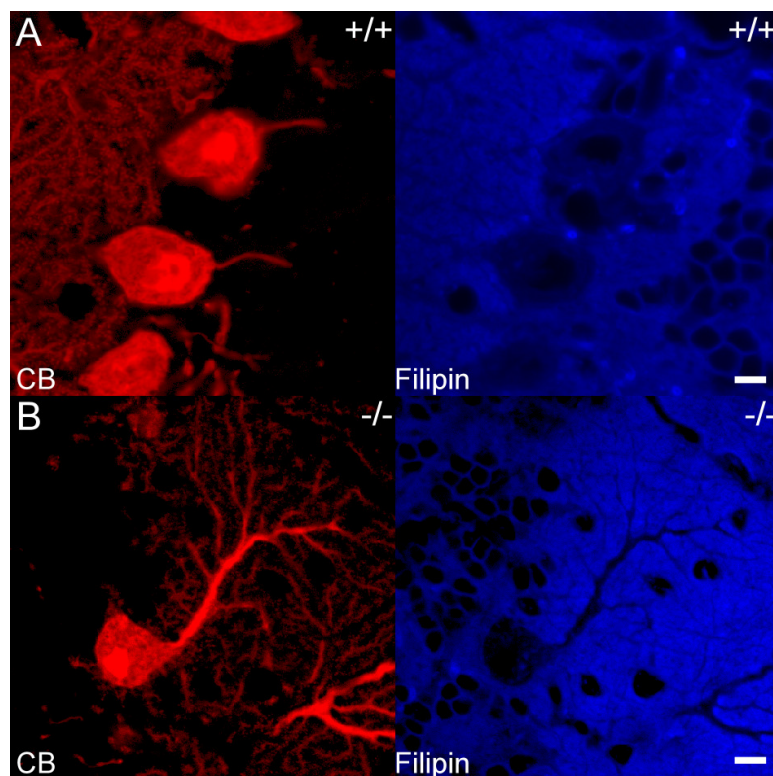


Abb. 4.20: Cholesterinverteilung in Purkinjezellkörpern. Der direkte Vergleich von Wildtyp (A, +/+) und DHAPAT-Knockout-Schnitten (B, -/-) gefärbt für Calbindin (rot) und Filipin (blau) zeigt keine ungewöhnlichen Akkumulationen von Cholesterin innerhalb der Purkinjezellen. Der Messbalken repräsentiert 10 μm (A, B).

5.1.7 Expressionsunterschiede im Kleinhirn

Um zu überprüfen, ob die bisher beobachteten Phänotypen sich auch im Expressionsmuster von Proteinen widerspiegeln, wurde das Expressionsprofil von jeweils vier Kontrolltieren und vier EL-defizienten Tieren zum Tag P15 analysiert. Dieses Alter wurde gewählt, weil zu diesem Zeitpunkt noch deutliche Myelinisierungsunterschiede bestehen, aber auch bereits die ersten axonalen Schwellungen zu sehen sind.

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde ein modifizierter Student T-Test herangezogen (Ge et al., 2003). Verkürzt gesagt wird dabei die Varianz einzelner Gene reduziert, indem die Varianzen aller Gene auf dem Chip genutzt werden. Erstaunlicherweise sind weder Gene der Myelinisierung, noch Gene des Kalziumhaushalts, noch wichtige synaptomale Gene betroffen. Die am signifikantesten betroffenen Gene sind in **Tab. 4.2** aufgelistet. Mehrfach gelistete Gene sind durch verschiedene Sonden detektiert worden.

Gen	Änderung	Modifizierter p-Wert	Beschreibung
Hspa5	0,555	0,013	heat shock protein 5
Hspa5	0,598	0,013	heat shock protein 5
Creld2	0,542	0,030	cysteine-rich with EGF-like domains 2
Armet	0,556	0,031	arginine-rich, mutated in early stage tumors
Hsp90b1	0,642	0,031	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1
Xbp1	0,584	0,031	X-box binding protein 1
C330006P03Rik	0,434	0,040	RIKEN cDNA C330006P03 gene
Pdi6	0,618	0,041	protein disulfide isomerase associated 6
Pdi4	0,663	0,045	protein disulfide isomerase associated 4
Hsp90b1	0,699	0,045	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1
Xbp1	0,602	0,045	X-box binding protein 1
Xbp1	0,575	0,045	X-box binding protein 1

Tab. 4.2: Microarray-Ergebnisse mit einem modifiziertem p-Wert unter 0,05. Die Auflistung erfolgt aufsteigend vom niedrigsten p-Wert beginnend.

Bemerkenswert an diesen Ergebnissen ist, dass alle relevanten Treffer um ca. die Hälfte abreguliert und dass mehrere die *unfolded protein response* (UPS) betreffen. Dazu gehören sowohl das Heatshockprotein Hsp90b1, als auch besonders BiP (Hspa5) und Xbp1, die beide direkte Regulatoren der UPS sind (Ron et al., 2008).

Die eher erwarteten Treffer wie z.B. MBP und PLP, die abundanten Myelinproteine, oder IP3R1 zeigten alle keine bzw. kaum eine Änderung auf dem Expressionslevel.

5.1.8 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden mehrere Phänotypen des DHAPAT-defizienten Tiermodells im zentralen Nervensystem, vor allem aber im Kleinhirn, beschrieben. Dazu zählen:

- Verzögerung in der Körnerzellwanderung (Kleinhirn)
- Veränderung des Foliationsmusters (Kleinhirn)
- Dysmyelinisierung (Kleinhirn und Kortex)
- Verlängerung des paranodalen Bereichs (Kleinhirn, Kortex und Sehnerv)
- Fehlerhafte Innervierung der Purkinjezellen (Kleinhirn)
- Axonale Schwellungen (Kleinhirn)
- Abregulation der UPS (Kleinhirn)

5.2 Etherlipide und oxidativer Stress

Da die Rolle von Etherlipiden im Zusammenhang mit oxidativem Stress in der Literatur kontrovers diskutiert wird (siehe Einleitung Kapitel 1.3.4), wurden gezielte Messungen in diese Richtung hin vorgenommen.

5.2.1 Antioxidativer Organstatus

Um einen grundlegenden Überblick über den oxidativen Status mehrerer Organe zu bekommen, wurde zuerst das Gesamtantioxidationspotential bestimmt. Als Organe wurden Groß- und Kleinhirn, Lunge und Leber ausgewählt. Sowohl das ZNS als auch die Lunge enthalten relativ hohe Konzentrationen an EL, während die Leber so gut wie keine EL enthält und deshalb als Kontrollorgan ausgewählt wurde.

Für einen genaueren Einblick wurde des Weiteren reduziertes und oxidiertes Glutathion sowie TBARS gemessen. Alle Messungen wurden in insgesamt acht Wildtyp-Tieren (+/+) und fünf EL-defizienten Tieren (-/-) durchgeführt.

Die TRAP-Messung hat in allen untersuchten Organen keinen Unterschied gezeigt (**Abb. 4.21**).

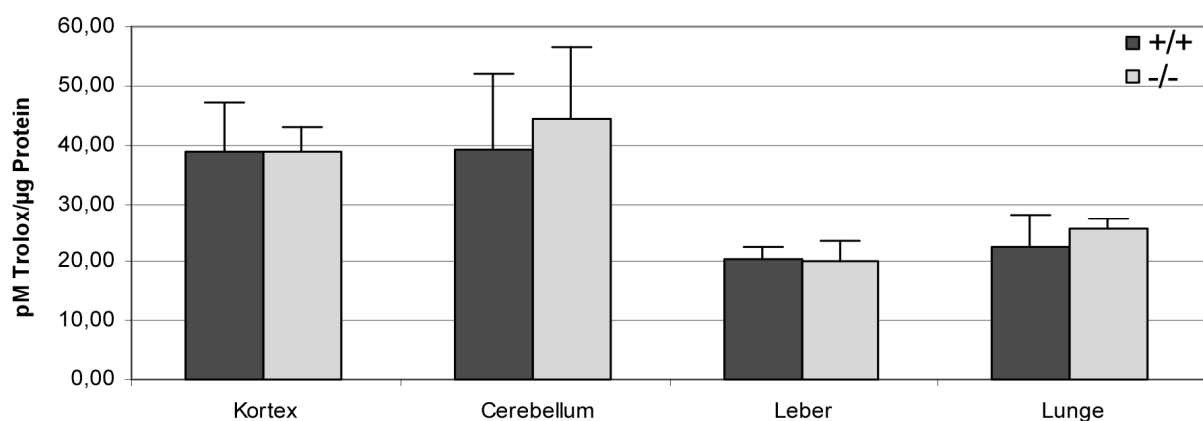


Abb. 4.21: TRAP-Messung in verschiedenen Organen. Die Einheit entspricht einer äquivalenten Konzentration an Trolox pro Mikrogramm Protein. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student t-Test. Es wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

Auch in der Glutathionmessung kann kein genereller Unterschied festgestellt werden. Die einzige signifikante Differenz besteht in einer Erhöhung der oxidierten Glutathionmenge in der Leber um ca. 70%, wobei die Menge an reduziertem Glutathion, die in der Leber sehr hoch ist, nicht signifikant verringert ist (**Abb. 4.22**).

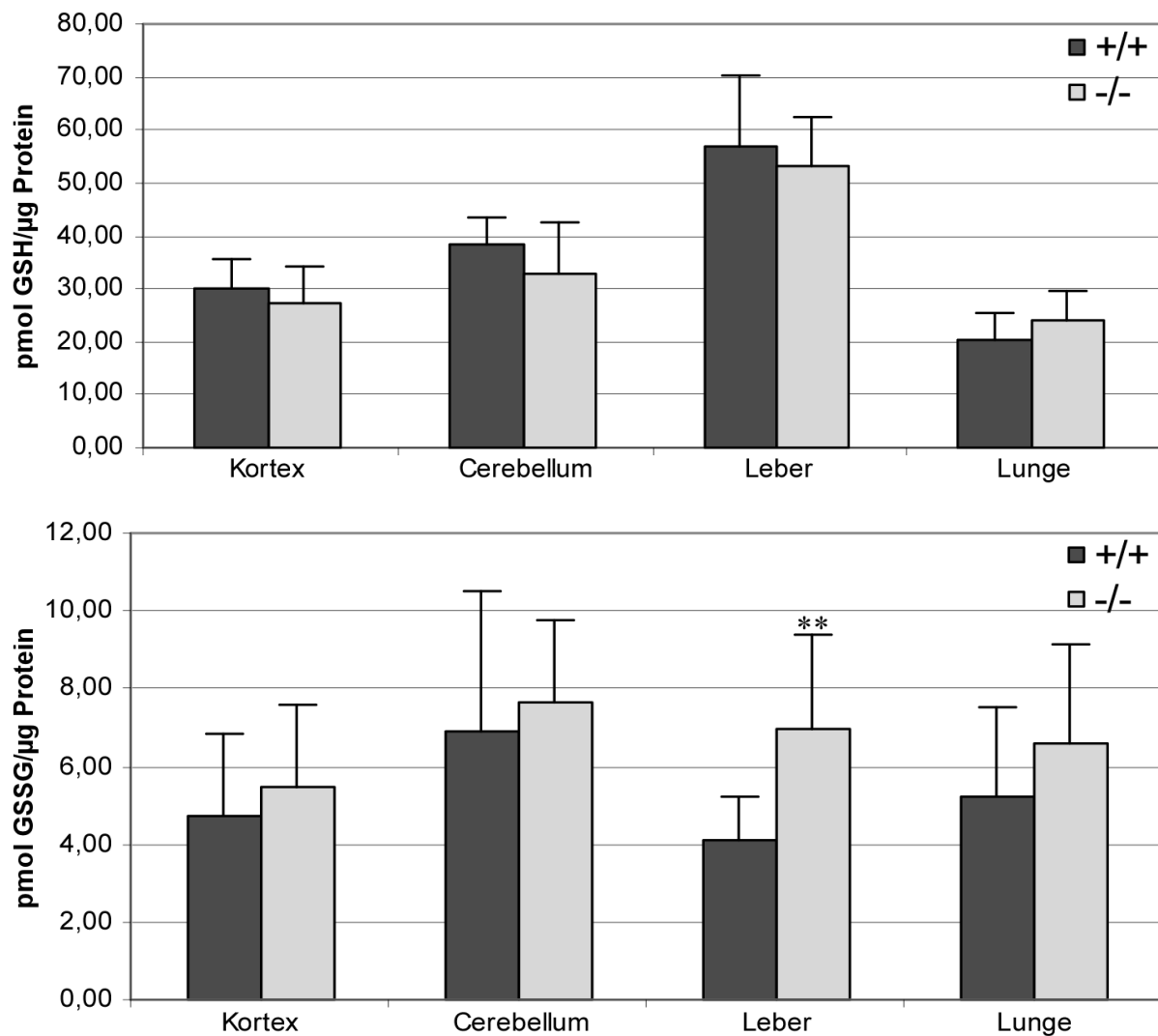


Abb. 4.22: Glutathionstatus in verschiedenen Organen. Das obere Bild zeigt die Menge an reduziertem Glutathion, das untere oxidiertes Glutathion. Der einzige signifikante Unterschied ist in der Menge an oxidiertem Glutathion in der Leber zu sehen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student t-Test (** $p \leq 0,025$). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

Da EL integraler Bestandteil der Zellmembran sind, wurde als letztes in allen vier Organen das Abbauprodukt der Lipidperoxidation Malondialdehyd in Form von TBARS gemessen.

Weder in der Leber noch im Blut (nicht gezeigt) und der Lunge ist ein Unterschied zwischen Kontrolle und EL-defizienten Tier messbar. Aber sowohl in Kortex als auch im Kleinhirn EL-defizienter Tiere zeigt sich eine 45% Reduktion des gemessenen Malondialdehyds (**Abb. 4.23**).

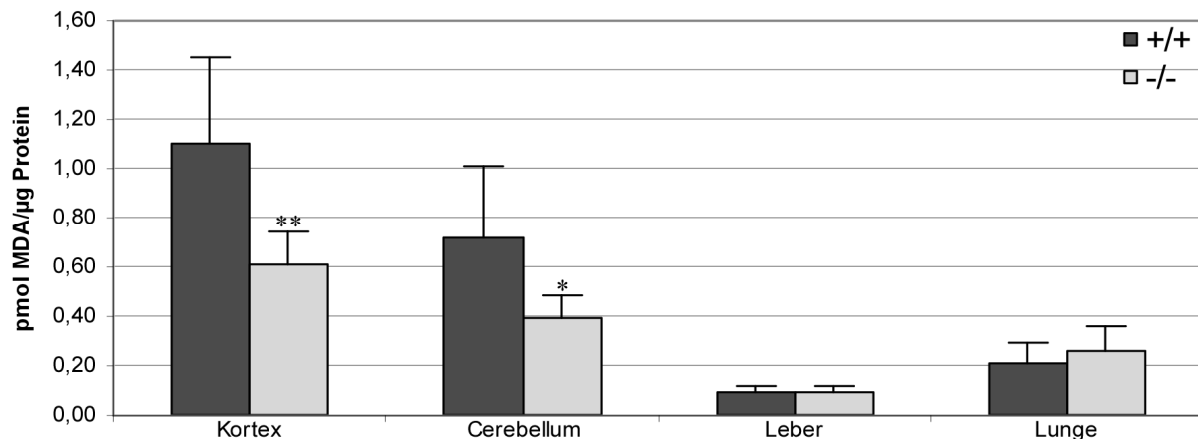


Abb. 4.23: Abbauprodukte der Lipidperoxidation in verschiedenen Organen. Gemessen wird in Pikomol Malondialdehyd (MDA) pro Mikrogramm Protein. Weder in Leber noch Lunge zeigen sich signifikante Unterschiede, aber in Kortex und Kleinhirn ist eine deutliche Reduktion der Abbauprodukte zu sehen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student t-Test (** $p \leq 0,025$, * $p \leq 0,05$). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

Zusammengefasst geben diese Ergebnisse keinen Hinweis, dass ein Mangel an PL generell zu oxidativem Stress führt. Interessant ist aber, dass nur im ZNS ein Unterschied bei den Abbauprodukten der Lipidperoxidation zu beobachten ist, obwohl auch in der Lunge der Gehalt an Etherlipiden sehr hoch ist. Wie erwartet ist in der Leber kein Unterschied zu erkennen, was möglicherweise mit dem geringen PL-Gehalt der Leber zusammenhängt.

5.2.2 künstlicher oxidativer Stress

Mehrere Gruppen haben *in vitro* Oxidationsexperimente mit Homogenaten und Lipidextrakten durchgeführt (Stadelmann-Ingrand et al., 2001; Sindelar et al., 1999). Bei diesen Untersuchungen wurde festgestellt, dass Plasmalogene sensitiv gegenüber oxidativem Stress sind (Stadelmann-Ingrand et al., 2001). Sindelar konnte zeigen, dass Lipidextrakte mit

Plasmalogenen weniger oxidationsanfällig in Bezug auf Abbau von PUFAs sind als Extrakte ohne Plasmalogene.

5.2.2.1 Homogenate

Die im Kapitel 1.2.1 beschriebenen Homogenate wurden verwendet, um den Abbau von PUFAs unter Eisen induziertem oxidativen Stress (Stadelmann-Ingrand et al., 2001) über TBARS zu messen.

In keinem Organ zeigt sich ein Unterschied im Bezug auf den Abbau von PUFAs. Beispielhaft wird der zeitliche Anstieg der MDA-Konzentration im Kortex gezeigt (**Abb. 4.24**). Es ist zwar ein genereller Anstieg der TBARS zu erkennen, aber der Unterschied zwischen Kontrollen und EL-defizienten Tieren ist nicht signifikant.

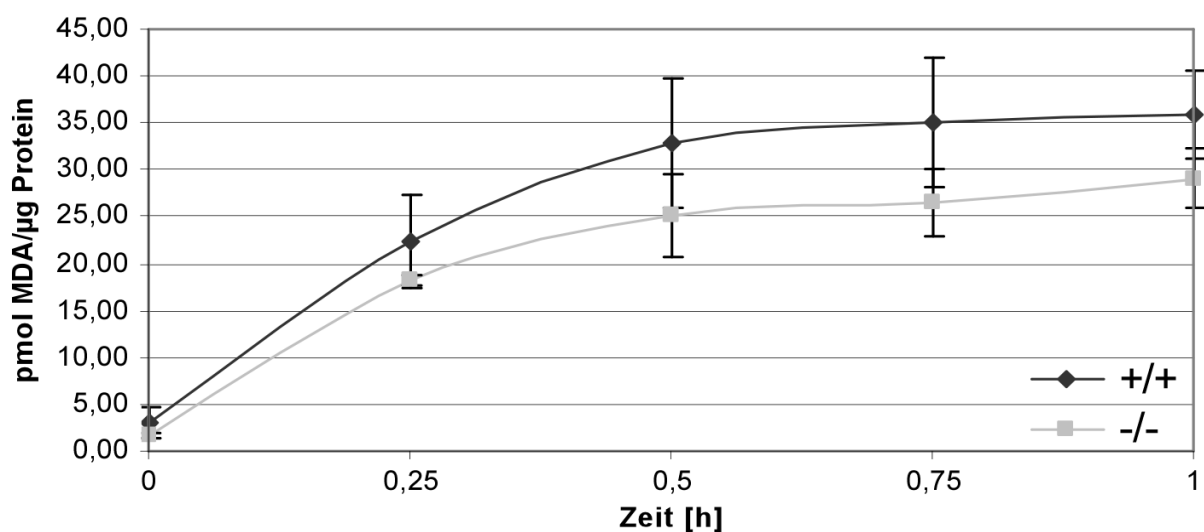


Abb. 4.24: Kinetik einer Eisen (Fe^{2+}) und Ascorbat induzierten Oxidation von kortikalen Homogenaten von Wildtyp- (+/+) und DHAPAT-defizienten Tieren (-/-). Gemessen wurden die Abbauprodukte der Lipidperoxidation mittels TBARS. Es wurde kein signifikanter Unterschied gefunden. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student t-Test. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

Bemerkenswerterweise bleiben die Werte der EL-defizienten Tieren sogar unter denen der Kontrollen, wenn auch nicht signifikant. In den anderen Organen war eine prinzipiell ähnliche Kinetik zu beobachten. Auch in Kontrollexperimente mit ABAP und ohne jede oxidative Substanz (Autoxidation) ist kein Unterschied zu sehen.

5.2.2.2 Lipidextrakte

Sindelar et al. (1999) untersuchten Lipidextrakte menschlicher Gehirnhomogenate, die mittels saurer Lyse und anschließender erneuter Aufreinigung der Lipide von Plasmalogenen befreit wurden. Diese Extrakte mit und ohne Plasmalogene wurden ebenso Eisen induziertem oxidativen Stress unterworfen und zeigten, dass ohne Plasmalogene deutlich mehr TBARS entstehen und PUFAs wesentlich schneller abgebaut werden.

Unerwarteterweise zeigen Lipidextrakte aus dem Gehirn von DHAPAT-defizienten Tieren nach einer Stunde Oxidation im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen eine über 60%ige Reduktion an TBARS (**Abb. 4.25**). Das entspricht einer noch größeren Reduktion, als sie bei den jeweiligen Messungen aus den Homogenaten beobachtet wurde.

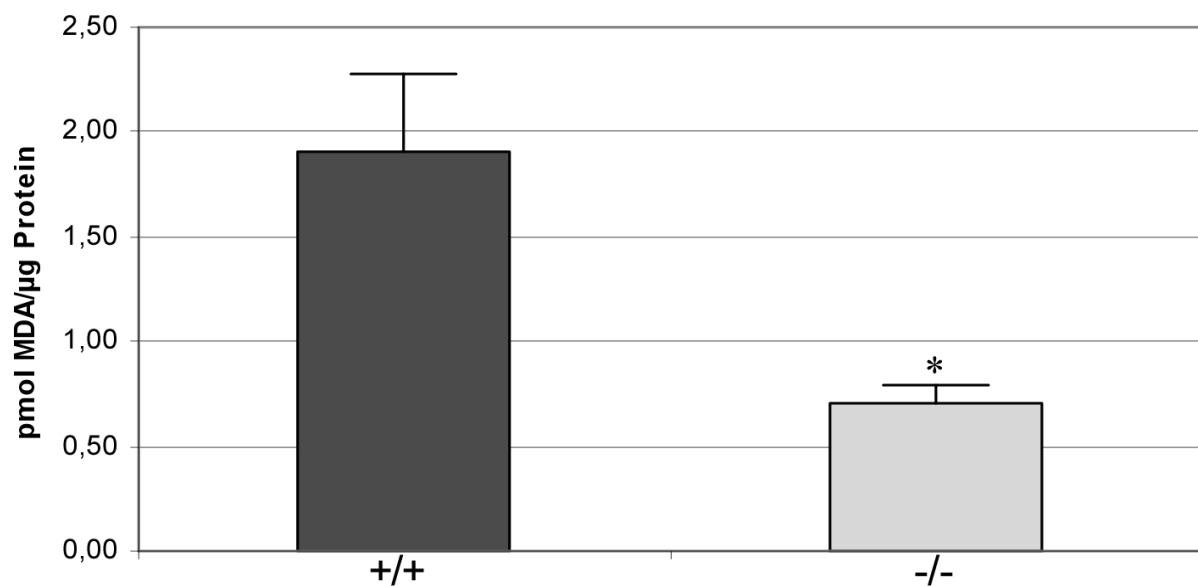


Abb. 4.25: Konzentration des Lipidperoxydationsabbauprodukts Malondialdehyd nach einer Stunde Oxidation mit Fe^{2+} und Ascorbat in Kontroll- (+/+) und EL-defizienten Tieren (-/-). Gemessen wurden jeweils zwei Homogenate. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student t-Test (* $p \leq 0,05$). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

5.2.2.3 Fibroblasten

Da in der Literatur auch mehrfach die Anfälligkeit von Zellen mit PL-Defizienz gegenüber oxidativem Stress dokumentiert ist (Zoeller et al, 1988 und 1999), wurde im folgenden Kapitel untersucht, inwiefern sich ABAP-induzierter oxidativer Stress auf das Überleben von

Fibroblasten aus Kontroll- und EL-defizienten Tieren auswirkt. Dazu wurden die Zellen einen Tag lang unterschiedlichen Konzentrationen von ABAP ausgesetzt und der Anteil der überlebenden Zellen bestimmt.

Die Ergebnisse belegen, dass Fibroblasten, die aus EL-defizienten Tieren gewonnen werden, anfälliger gegenüber oxidativem Stress sind als entsprechende Kontrollen (**Abb. 4.26**). Die Messung der TBARS in unbehandelten Zellen (sowohl Kontrollen als auch EL-defiziente Zellen) dagegen zeigte jedoch keinen Unterschied.

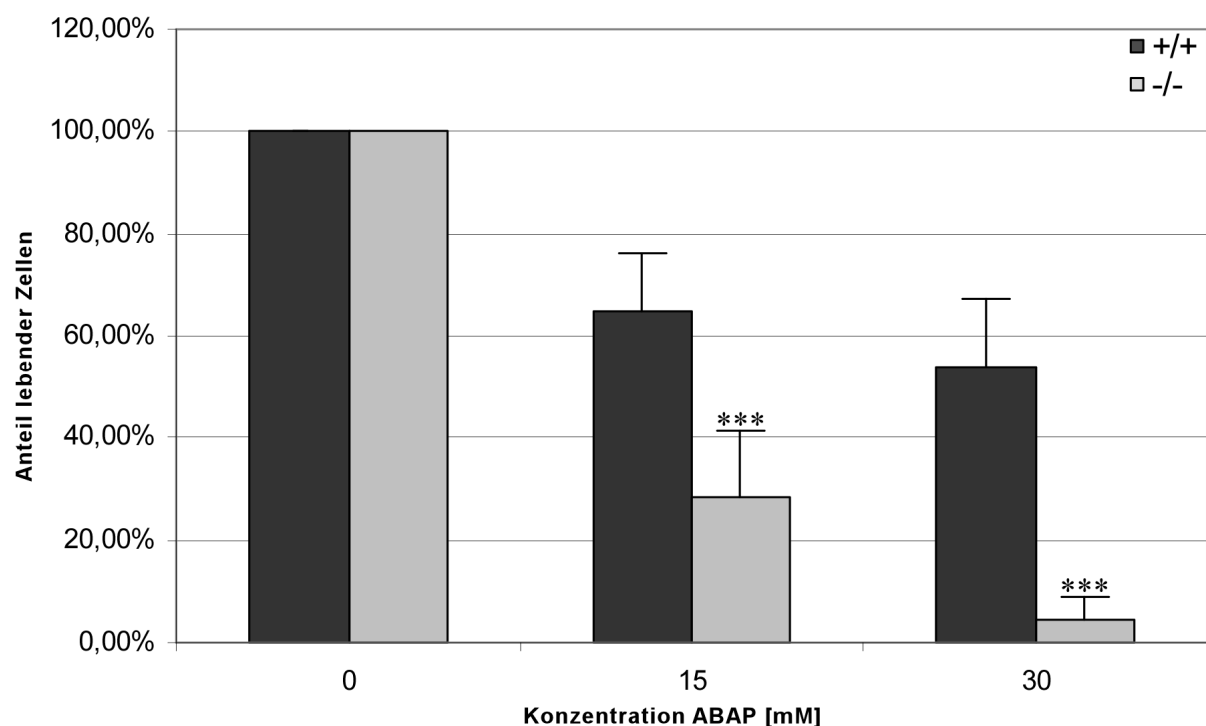


Abb. 4.26: Zelluläre Resistenz gegenüber ABAP-induziertem oxidativen Stress in Wildtyp- (+/+) und DHAPAT-Knockout-Fibroblasten (-/-). EL-defiziente Zellen sind deutlich anfälliger gegenüber oxidativem Stress. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student t-Test (***) $p \leq 0,001$. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

5.2.3 Zusammenfassung

Die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Keine generelle Anzeichen für oxidativen Stress

- Weniger Lipidperoxidation im ZNS von EL-defizienten Mäusen
- Deutlich weniger Lipidperoxidation in EL-freien Lipidextrakten unter künstlichem oxidativen Stress
- Verringerte Toleranz von EL-defizienten Fibroblasten gegenüber oxidativen Stress

6 Diskussion

6.1 Etherlipiddefizienz im ZNS

6.1.1 Foliationsmuster und Körnerzellenmigration

Die in dieser Arbeit verwendete DHAPAT-Knockout-Maus wurde aus R1 embryonalen Stammzellen der Mauslinie 129 und C57Bl/6 Muttertieren generiert. Da die unterschiedlichen Labormausstämme verschiedene Foliationsmuster haben, ist es angebracht, diese zu vergleichen. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass die hier beobachtete Veränderung des Foliationsmusters auf einem gemischten genetischen Hintergrund beruht. Allerdings weißt die C57Bl/6-Linie ein vergleichsweise wenig komplexes Muster verglichen mit der FVB/N- oder 129-Linie (Faust et al., 2001; Sillitoe und Joyner, 2007) auf. Da jedoch die Änderung in mehr als 15 EL-defizienten Gehirnen gefunden wurde, scheint es wahrscheinlicher, dass der Unterschied im Foliationsmuster auf EL-Defizienz beruht.

Die Folien und Fissuren des Kleinhirns entstehen durch eine regulierte Zellproliferation und –migration. Die Ankerpunkte der Fissuren sind dabei Fixpunkte und die einzelnen Folien wachsen nach außen. Das Wachstum beruht dabei vor allem auf einer stark erhöhten Proliferationsrate von Körnerzellvorläufern. Die Ankerpunkte werden durch eine beginnende Faltung der noch ungeordneten Purkinjezellschicht angezeigt (Sudarov und Joyner, 2007). Da in unserem Modell auch eine Verzögerung der Zellmigration von Körnerzellen festgestellt wurde, besteht die Möglichkeit, dass die Änderungen im Foliationsmuster auf dieser Verzögerung beruhen.

Die Migration von Körnerzellen wird von einer Vielzahl von Faktoren gesteuert (Komuro und Yacubova, 2003; Gressens 2006). Darunter befinden sich z.B. Neurotrophin-3, Neuregulin, Bindegewebefaktor 1 α , Ephrin-B2, Tenascins und Platelet Activating Factor (PAF). Eine weitere Rolle spielen dabei auch spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (Komuro und Yacubova, 2003). PAF, ein EL, entfaltet seine Aktivität über die Stimulation seines Rezeptors (PAFR). In Mäusen mit PAFR-Defizienz wurde auch tatsächlich eine verminderte Migration beobachtet (Tokuoka et al., 2003). PAFR-Aktivität und die Aktivität der meisten anderen Faktoren beruht auch auf deren korrekter Einsortierung in lipid raft microdomains

(LRM) (Nguyen und Taub, 2002; Suzuki et al., 2004; Yang et al., 2004; Bollinger et al., 2005; Meyer et al., 2007). Aus diesem Grund kann auch eine fehlerhafte Assemblierung von LRM durch die Abwesenheit von EL für die Änderungen im Foliationsmuster bzw. in der Körnerzellmigration verantwortlich sein.

6.1.2 Lipide und Lipid-verankerte Proteine bei der Myelinbiogenese

Wie wichtig Lipide für die korrekte Ausbildung der Myelinscheide sind, zeigt die Arbeit von Saher et al. (2005), in der durch einen konditionellen Knockout in Oligodendrozyten die Cholesterinsynthese ausgeschaltet wurde. Diese Mäuse sind ataxisch, haben einen Tremor und sterben frühzeitig. Vor allem aber ist ihre Myelinisierung im Kortex, Corpus callosum und in der weißen Substanz des Rückenmarks weitgehend zurückgeblieben. Andere Regionen dagegen wie z.B. die graue Substanz des Rückenmarks weisen eine normale Myelinisierung auf. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei dem hier beschriebenen PL-defizienten Tier beobachtet. Auch andere Lipide wie z.B. Sulfatide (Marcus et al., 2006), Ganglioside (Susuki et al., 2007) und Sphingolipide (Decker et al., 2003) sind für den Aufbau und Erhalt des Myelins notwendig.

Da aber die Resultate meiner Diplomarbeit, in der eine Akkumulation von Cholesterin innerhalb von kultivierten Zellen des ZNS, bzw. die Resultate von Rodemer et al. (2003), der gezeigt hat, dass auch in Fibroblasten diese Akkumulation zu sehen ist, nicht in den Filipin-gefärbten Kleinhirnschnitten bestätigt werden konnte, ist es zumindest fraglich, ob die Dysmyelinisierung direkt auf das Fehlen von EL zurückzuführen ist

Vielmehr besteht die Möglichkeit, dass EL-Defizienz Einfluss auf die korrekte Assemblierung der LRM nimmt. Viele Proteine, wie z.B. der bereits erwähnte PFAR oder Integrine, die für die Kommunikation zwischen Oligodendrozyten und Axonen sehr wichtig sind, sind in LRMs lokalisiert und eine Störung der Lipidzusammensetzung kann auf die Myelinisierung Einfluss nehmen (Decker et al., 2004).

Eine weitere Klasse von Proteinen, die in LRMs lokalisiert sind, sind Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine. Diese bei Eukaryonten und einigen Archaeobakterienstämmen vorkommenden integralen Membranproteine inserieren mit einem Lipidanker in die Plasmamembran. Die Synthese des GPI-Ankers und das Anhängen

desselben an den C-Terminus eines Proteins finden im endoplasmatischen Retikulum statt. Der Anker selbst enthält ein Inositolphospholipid. Interessanterweise kann dieser Lipidanteil auch eine Etherbindung an der sn1-Position besitzen, wie es für einige Proteine wie z.B. Thy1 oder PLAP (placental alkaline phosphatase) nachgewiesen wurde (Ikezawa et al., 2002; Singh et al., 1994). Da bisher ungeklärt ist, ob für die Ausbildung dieser Etherlipidbindung der peroxisomale Syntheseweg essentiell ist, besteht die Möglichkeit, dass die DHAPAT-Defizienz direkten Einfluss auf die Synthese von GPI-Ankern und damit auf GPI-verankerte Protein hat.

In der Myelinmembran und der damit verbundenen Axonplasmamembran sind zahlreiche GPI-bzw. Lipid-verankerte Proteine enthalten, die essentielle Funktionen bei der Biogenese oder der Aufrechterhaltung dieser Membranen ausführen (**Abb. 5.1**). Aufgrund des möglichen Effekts der PL-Defizienz auf die Bildung und Zusammensetzung von LRMs, sowie der möglichen Beeinträchtigung der GPI-Anker-Synthese könnten viele dieser Proteine in ihrer Aktivität beeinflusst sein.

F3/Contactin ist GPI-verankert und im paranodalen Bereich der Plasmamembran des Axons in LRMs lokalisiert (Bonnon et al., 2003). Es dient als zentrale Schnittstelle für mehrere Prozesse. Zum einen bindet es an das Protein Caspr, das ohne diese Bindung nicht bis zur Plasmamembran transportiert wird (Faivre-Sarrailh et al., 2000; Boyle et al., 2001). Zum anderen bindet dieser Komplex das Protein Neurofascin-155 in der Oligodendrozytenmembran und stellt so den extrazellulären Kontakt zwischen beiden Membranen her (Bonnon et al., 2003). Zu sehen ist der Kontakt im elektronenmikroskopischen Bild als elektronendichte transverse Banden, auch septate-like junctions genannt, zwischen den terminalen Loops des Myelins und der axonalen Plasmamembran (Einheber et al., 2006; Boyle et al., 2001; Poliak und Peles, 2003; Garcia-Fresco et al., 2006). Über das Protein 4.1B wird der cytoplasmatische Anteil von Caspr und damit der gesamte Komplex mit dem axonalen Actin-Cytoskelett verknüpft (Denisenko-Nehrbass et al., 2003; Ogawa et al., 2006) (**Abb. 5.1**). Kramer et al. (1997 und 1999) konnte zeigen, dass F3/Contactin in LRMs lokalisiert ist. Diese Assoziation mit LRMs war in EL-defizienten Mäusen reduziert (Rodemer et al., 2003).

Neben der Organisation der septate-like junctions spielt F3/Contactin auch eine Rolle bei der Zielfindung der Parallelfaseraxone und generell der neuronalen Interaktion vor allem im Cerebellum (Berglund et al., 1999; Garcia-Fresco et al., 2006).

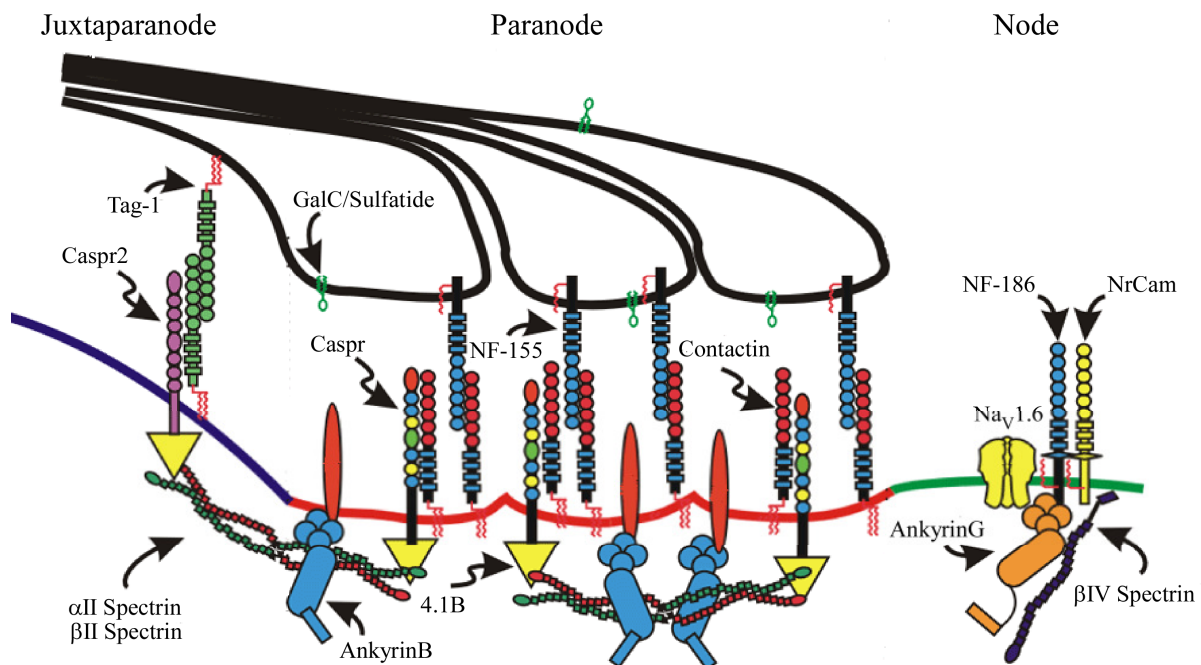


Abb. 5.1: Schematische Ansicht eines myelinisierten Axons mit Membranproteinen (nach Ogawa et al., 2006).

Ein weiteres GPI-verankertes Protein im Bereich des Ranvierschen Schnürrings ist das Protein TAG-1. Es übernimmt mehrere Funktionen bei der Biogenese und Aufrechterhaltung der Myelinscheide. Während der Biogenese des ZNS spielt es eine Rolle in der Axonwanderung von sensorischen Neuronen und steuert die tangentielle Neuronenwanderung in der Entstehung der Medulla oblongata und des Neocortex. Im adulten Stadium wird TAG-1 sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem von myelinisierenden Gliazellen exprimiert und ist im Bereich des Ranvierschen Schnürrings lokalisiert. Experimentelle Daten deuten darauf hin, dass TAG-1 als strukturgebende Komponente zusammen mit Caspr2 Kaliumkanäle im juxtaparanodalen Bereich konzentriert (Denaxa et al., 2005).

Zwei weitere essentielle Proteine des Ranvierschen Schnürrings, die zwar nicht GPI-verankert sind dafür aber durch Palmitoylierung einen Lipidanker besitzen, sind die Familie der Neurofascine und NrCam. Bei den Neurofascinen sind die Isoformen 155 und 185 am

Ranvierschen Schnürring lokalisiert (**Abb. 5.1**) und integraler Bestandteil der Struktur. Für Neurofascin-155 konnte gezeigt werden, dass es einerseits mit LRMs assoziiert ist und dass eine Störung der Myelinisierung z.B. im Verlauf der multiplen Sklerose zu einer Reduzierung dieser Assoziation führt (Maier et al., 2007). In Gangliosid-defizienten Mäusen konnte ebenso festgestellt werden, dass die richtige Sortierung von Neurofascin-155 in LRMs beeinträchtigt ist (Suzuki et al., 2007). Ein weiterer wichtiger Befund im Zusammenhang mit Neurofascin-155 wurde in CGT- und CST-Knockout-Modellen erhoben. In der Ceramid-Galactosyltransferase-defizienten (CGT) Maus können sowohl Galactocerebroside als auch Sulfatide, zwei wichtige Lipidklassen, die vor allem im Myelin angereichert sind, nicht gebildet werden, während im CST-Modell nur die Sulfatide fehlen. Es wurde in diesen Modellen beobachtet, dass das Fehlen der Galactocerebroside und der Sulfatide auch eine Reduktion der Neurofascin-155-Konzentration in LRMs nach sich zieht. In beiden Tiermodellen wurde festgestellt, dass die terminalen Loops der Myelinscheiden nicht wie in den Kontrollen klar strukturiert auf der axonalen Membran sitzen, sondern sich teilweise ablösen oder abnormale Anordnungen zeigen. Eine Verlängerung des gesamten nodalen Bereichs und das teilweise Fehlen der transversen Banden der septate-like junctions wurde ähnlich zu den in dieser Arbeit festgestellten Veränderungen beschrieben. Alle diese aufgeführten Phänotypen waren mit steigendem Alter stärker ausgeprägt (Ishibashi und Dupree, 2002; Marcus et al, 2006; Honke et al., 2004, Hoshi et al., 2007). Ein Phänotyp der CGT- bzw. CST-Maus konnte allerdings nicht in unserem Modell bestätigt werden. Die räumliche Trennung zwischen Kalium- und Natriumkanälen ist in EL-defizienten Mäusen nicht aufgehoben.

Ähnlich wie mit Neurofascin-155 verhält es sich mit NrCAM. Es ist gleichfalls ein integraler Bestandteil der Struktur des Ranvierschen Schnürrings und für die anfängliche Clusterung der Natriumkanäle und die Anbindung dieser an das Actincytoskelett via AnkyrinG verantwortlich (Custer et al., 2003). Falk et. al (2004) konnten zeigen, dass die Fähigkeit an das Actincytoskelett zu binden, abhängig ist von der Palmitoylierung und der damit verbundenen Einsortierung von NrCam in LRMs. Interessanterweise zeigt ein Doppelknockout von NrCam und L1, einem dem NrCam ähnlichen Protein (beide gehören zur L1-Superfamilie), schwere Foliationsdefekte bzw. fehlende oder nur rudimentär gebildete Fissuren und eine verringerte Überlebensrate der Körnerzellen. Es wird vermutet, dass beide Proteine zumindest teilweise in ihrer Funktion überlappen (Sakurai et al., 2001).

Als letztes muss in diesem Abschnitt noch das LRM-assoziierte Protein MAL erwähnt werden. Das Knockout-Modell dieses Proteins zeigt unorganisierte und verlängerte paranodale Bereiche. Außerdem lassen LRM-Präparationen, die mittels Western Blot analysiert wurden vermuten, dass MAL eine Rolle bei der Sortierung der Proteine Neurofascin-155, MBP und MAG spielt (Schaeren-Wiemers et al., 2004).

Man kann also über diese Betrachtungen das Fazit ziehen, dass für die richtige Entwicklung des ZNS sowie für die vollständige und korrekte Assemblierung des Ranvierschen Schnürrings sowohl die Bildung von LRMs in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung der Membran als auch die richtige Verankerung der Proteine, sei es durch GPI-Verankerung, oder durch Palmitoylierung, entscheidend ist. Auf beide Prozesse könnte EL-Defizienz Auswirkungen haben und somit die in dieser Arbeit beschriebenen Phänotypen hervorrufen.

6.1.3 Purkinjzellinnervierung

Die Entwicklung der Purkinjzellinnervierung durch PF und KF ist ein sehr dynamischer Prozess. Während der postnatalen Entwicklung des Kleinhirns stellt jede KF Synapsen zu mehreren Purkinjzellen her. Da das Axon aus der Körnerzellschicht kommt, entstehen die ersten Kontakte am Zellkörper und am proximalen Dendritenbaum. Etwa 10 Tage nach der Geburt werden einige dieser Kontakte wieder abgebaut, so dass am Ende jede Kletterfaser genau eine Purkinjzelle innerviert. Danach werden die Synapsen, die wie erwähnt anfänglich am Zellkörper und am proximalen Dendritenbaum gebildet werden, an den distalen Dendritenbaum der Purkinjzelle verlagert (Yuste und Bonhoeffer, 2004; Sugihara, 2006). Für diesen komplexen Prozess scheinen nach den hier gezeigten Ergebnissen auch EL benötigt zu werden, da in unserem Mausmodell die synaptische Remodellierung nicht oder nur teilweise stattfindet.

Neu veröffentlichte Ergebnisse belegen, dass die Innervierung der Purkinjzelle ein kompetitiver Prozess zwischen Kletter- und Parallelfasern ist. Entscheidend dabei ist vor allem die synaptische Aktivität. Glutamat-Rezeptor $\delta 2$ -abhängige Synapsen unterstützen dabei die Bindung der Parallelfaser an die Purkinjzellen, während spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (VDCC; voltage dependent calcium channels) die Kletterfaser favorisieren. Knockoutstudien zeigen, dass im Falle des Fehlens einer Aktivität das Gebiet, in dem eine der

Fasern normalerweise Synapsen zu den Purkinjezellen ausbildet, reduziert wird zugunsten des anderen Fasertyps (Ichikawa et al., 2002; Miyazaki et al., 2004). Da in dem hier beschriebenen Modell die Kletterfaserausbreitung gehemmt zu sein scheint, erklärt dies möglicherweise, warum Parallelfasersynapsen am Zellsoma der Purkinjezelle zu finden sind und warum sich das Prä- zu Postsynapse-Verhältnis stark erhöht hat. Interessanterweise ähnelt die DHAPAT-defiziente Maus sehr dem VDCC α 1A-Knockout (Katoh et al., 2007). Ein weiteres Mausmodell entspricht sehr exakt dem hier beschriebenen. Eine Missense-Mutation im Myosin Va verursacht ganz ähnliche Veränderung der Innervierung der Purkinjezelle wie sie bei der DHAPAT-defizienten Maus vorliegt (Sotelo, 1990; Takagishi et al., 2007). Zusätzlich wurde Myosin Va – Defizienz in Verbindung gebracht mit eingeschränktem Transport von IP3R1-enthaltenden glatten ER-Stacks in den Dendritenbaum von Purkinjezellen (Langford, 2002). Dieser Defekt könnte die Signaltransduktion von kalziumgesteuerten Synapsen beeinträchtigen und somit für reduzierte Innervierung durch Kletterfasern verantwortlich sein.

6.1.4 Axonale Schwellungen

Beeinträchtigungen im Transport von ER-Stacks innerhalb der Purkinjezelle und/oder eine Störungen des intrazellulären Kalziumhaushalts könnten durchaus mit ein Grund für die Entstehung der axonalen Schwellungen sein. Außerdem gibt es noch eine Reihe anderer Bedingungen unter denen axonale Schwellungen im Kleinhirn auftreten:

- Verabreichung von metabotropischen Glutamatrezeptor-Antagonisten (Banno und Kohno, 1998)
- Deletion der glialen, zyklischen Nukleotidphosphodiesterase (Lappe-Siefke et al., 2003)
- Deletion von F3/Contactin (Berglund et al., 1999)
- Deletion von Caspr (Garcia-Fresco et al., 2006; Pillai et al., 2007)
- Deletion von CGT (Garcia-Fresco et al., 2006)
- Neurodegenerative Krankheiten wie cerebrospinale Ataxie, Alzheimer und amyotrophe Lateralsklerose (Garcia-Fresco et al., 2006)

Unter den Faktoren sind einerseits solche vertreten, die direkte Einflüsse auf den Ranvierschen Schnürring ausüben, andererseits solche, die sich allgemein auf die neuronale Aktivität bzw. neuronalen Zelltod auswirken. Besonders die Caspr- und Contactin-Mausmodelle weisen darauf hin, dass eventuell der anterograde Transport am Ranvierschen Schnürring beeinträchtigt ist. Auf molekularer Ebene sind diese beiden Proteine über 4.1B, Ankyrin B, α II und β II Spectrin mit dem Aktinzytoskelett verknüpft (**Abb. 5.1**) (Garcia-Fresco et al., 2006; Ogawa et al., 2006). So könnte eine Störung der axo-glialen Verbindung wie in Kapitel 5.2 beschrieben indirekt Auswirkungen auf das Aktinzytoskelett am Ranvierschen Schnürring haben und so durch Störung des axonalen Transport dort stören und die Akkumulation von zellulären Komponenten bewirken.

In eine andere Richtung weisen Ergebnisse, die belegen, dass die Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers, sehr stark von der Plasmalogen-Konzentration in der Membran abhängig ist (Hale et al., 1998). Diese Art des Ionenaustausches ist im ZNS weit verbreitet und findet sich auch in myelinisierten Axonen (Steffensen et al., 1997). Verminderte Aktivität könnte eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration zur Folge haben, mit dem Ergebnis, dass intrazelluläres Kalzium in interne Kompartimente wie z.B. Mitochondrien oder endoplasmatischen Retikulum eingelagert wird (Condrescu et al., 2002). Diese Ergebnisse, zusammen mit den ebenfalls mit Kalzium in Verbindung stehenden VDCC- und Myosin Va-Phänotypen der Purkinjezellinnervation, lassen darauf schließen, dass Etherlipide sehr wohl einen Einfluss auf den zellulären Kalziumhaushalt haben können. Experimentell ließe sich diese Vermutung überprüfen durch Studien der zellulären Kalziumdynamik in der Zellkultur oder in organotypischen Hirnschnittkulturen.

6.1.5 Unfolded Protein Response

Ebenfalls Veränderungen des ERs betreffend sind die Befunde aus den Microarray-Analysen. Verschiedene Proteine der UPR, darunter das Glukose-regulierte Protein 78 (Grp78/BiP), Grp94, PDI und X-box bindendes Protein 1 (Xbp1) erscheinen danach vermindert in ihrer Expression

Das UPR-System regelt die Homöostase der Proteinfaltung und Assemblierung im ER. Seine Aktivierung zieht einerseits einen Translationsstop vermittelt durch PERK (PKR-like

endoplasmic reticulum kinase) andererseits die transkriptionelle Induktion verschiedener Chaperone durch alternatives Splicing der mRNA des Transkriptionsfaktors Xbp1 nach sich (Abb. 5.2).

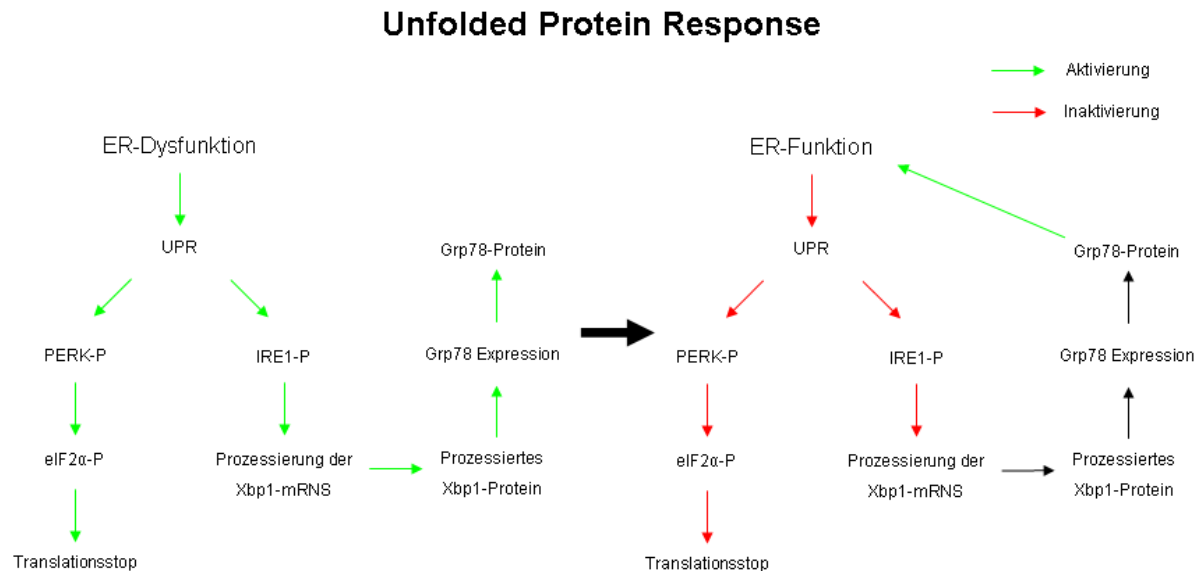


Abb. 5.2: Flussdiagramm der UPR. Eine Aktivierung des UPR-Systems bewirkt einen Translationsstopp durch die Phosphorylierung des Translationsfaktors eIF2 α und eine Induktion verschiedener Proteine, darunter auch Proteine der UPR selbst mittels des Transkriptionsfaktors Xbp1 (nach Paschen, 2003).

Zentrales Element der UPR-Aktivierung ist das Protein Grp78. Solange die Konzentration ungefalteter bzw. missgefalteter Proteine gering ist, bindet Grp78 an die ER-residenten Proteine PERK, Ire1 und Atf6 und verhindert so die Aktivierung der UPR. Bei erhöhtem ER-Stress, der vor allem durch ungefaltete bzw. missgefaltete Proteine ausgelöst wird, wird Grp78 aus diesen Bindungen befreit. In der Folge dimerisieren Ire1 und PERK und ermöglichen damit ihre Autophosphorylierung. In diesem Zustand phosphoryliert PERK den Translationsfaktor eIF2 α und inaktiviert die Proteintranslation. Durch Excision eines 26 Basenpaare-Abschnitts aus der mRNA von Xbp1 induziert Ire1 mittels seiner Endonukleaseaktivität einen Frameshift, der zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors und damit zur erhöhten Expression der UPR-Proteine, Xbp1 und Grp78, sowie des Chaperons Grp94 führt. Atf6 hingegen wandert ohne die Bindung an Grp78 in den Golgi-Apparat, wird dort gespalten und in aktiver Form in den Kern transportiert, wo es ähnlich wie Xbp1 ebenfalls als Transkriptionsfaktor wirkt (Abb. 5.3) (Paschen, 2003; Karar et al., 2008).

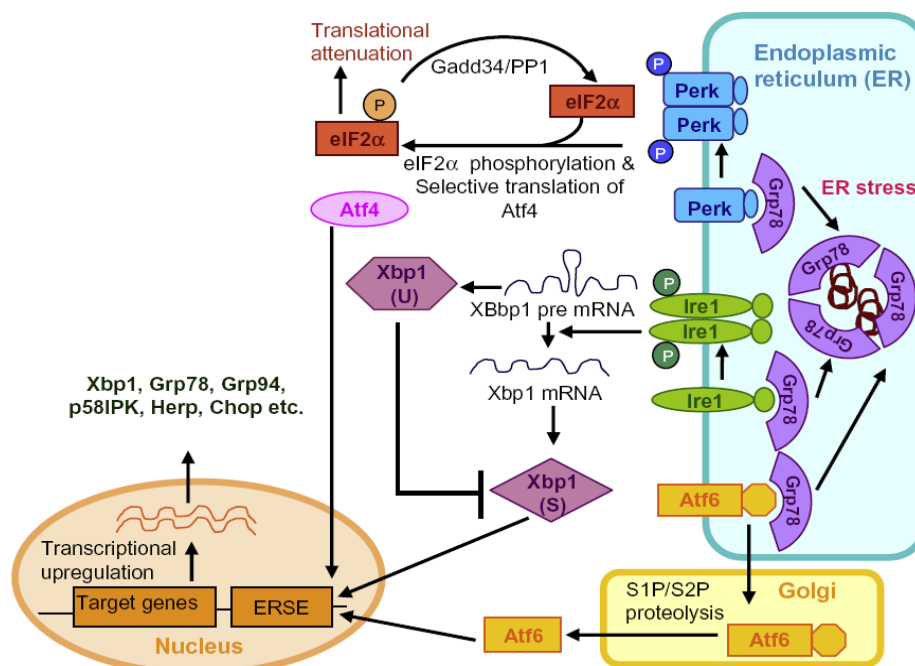


Abb. 5.3: Überblick über die Regulation des UPR-System. Grp78 verhindert die Dimerisierung der Transmembranproteine Perk und Ire1. Im Falle der Dimerisierung autophosphoryliert sich das Dimer und leitet das Signal in das Zytoplasma weiter. Der Transkriptionsfaktor Atf6 hingegen wird von Grp78 im ER festgehalten. Ohne die Bindung an Grp78 wandert Atf6 in den Golgi-Apparat, wo durch Proteolyse der aktive Transkriptionsfaktor freigesetzt wird (nach Karar et al., 2008).

Bei der in dieser Arbeit festgestellten Reduktion der Expression von Proteinen, die entweder dem UPR-System angehören oder zu den von diesem System induzierten Proteinen zählen, stellt sich die Frage, ob ein direkter oder indirekter Effekt der DHAPAT-Defizienz vorliegt. Bei einem direkten Effekt würde das Fehlen von EL und/oder ein funktionell beeinträchtigtes GPI-verankertes Protein (siehe Kapitel 5.1.2) direkt das UPR-System beeinflussen. Der naheliegendste Ansatzpunkt wären die involvierten Membranproteine PERK, Ire1 und Atf6, wobei Ire1 und Atf6 direkten Einfluss auf die Expression der UPR-Proteine haben. Bisher gibt es in der Literatur keine Hinweise, dass Lipide direkten Einfluss auf die Aktivität dieser Proteine ausüben könnten, obwohl Administration von freien Fettsäuren oder Lipopolysacchariden ER-Stress induzieren. Dieser ER-Stress verursacht aber die Aktivierung und somit verstärkte Expression des UPR-Systems (Cunha et al., 2008; Tazi et al., 2007). Auch andere Formen des ER-Stresses, wie z.B. die Störung der Kalzium-Homöostase zwischen ER und Zytosol, induzieren das UPR-System (Paschen, 2008). Interessanterweise

zeigt ein PERK-Knockout-Modell in pankreatischen β -Zellen und glatten Blasenmuskelzellen eine verlangsamte Kalziumfreisetzung aus dem ER, obwohl andere Kalzium regulierende Faktoren, wie IP3R-Lokalisation, -Expression und -Kinetik, $\text{Ca}_v1.2$ -Strom und RyR-Aktivität nicht beeinflusst waren. Koimmunopräzipitationsstudien ließen aber erkennen, dass zwar kaum Änderungen in der Gesamtproteinmenge von Serca2b, IP3R Isoform 3 und Plasmamembrankaliumkanälen eintraten, dafür aber die Interaktion dieser Proteine untereinander fast vollständig zum Erliegen kam (Huang et al., 2006). Auch andere Bedingungen, wie S-Nitrosoglutathion-Applikation, die gleichermaßen ER-Stress induzierten, führten zu einer Beeinflussung von in den Kalziumhaushalt involvierten Proteinen (He et al., 2004).

Einen direkten Zusammenhang zwischen Lipiden und dem UPR-System bietet ATF6. Zeng et al. (2004) zeigten, dass ATF6 das Sterol-regulatorische-Element-bindende Protein 2 (SREBP2) inhibiert und auf diese Weise die Expression Lipid synthetisierender Enzyme unterdrückt.

Nur wenige Bedingungen sind beschrieben, die zu einer Reduktion der Expression von UPR-Proteinen führen. So berichten z. B. Karar et al. (2008), dass in der Niere von Mäusen, die einer akuten hypobarischen Hypoxie ausgesetzt waren, die Expression von Grp78, Grp94, Calnexin und Calreticulin reduziert war. Gleichzeitig war das UPR-System aber sowohl im Herz als auch im Gehirn dieser Mäuse induziert. Auch Paschen (2008) beschreibt, dass eine lokale Ischämie im Gehirn das UPR-System aktiviert. Interessanterweise bewirkt eine solche Ischämie auch eine Verlangsamung der Kalziumaufnahme in das ER unabhängig von der Konzentration an ATP (Parsons et al., 1997).

Andere Bedingungen, die eine Reduktion der Expression des UPR-Systems zur Folge haben, sind die Überexpression der Transkriptionsvarianten 1-3 von Ubiquilin 1 (Lu et al., 2008) und die Administration von Kainat (Krapfenbauer et al., 2001). Die Ubiquilin 1-Varianten verhindern die Induktion des C/EBP homologen Protein, das wiederum während der UPR aktiviert wird und bei zu langer Aktivierung zum Zelltod führt.

Als Schlussfolgerung kann man sagen, dass ER-Stress im Allgemeinen eher zur Erhöhung der Expression der entsprechenden UPR-Proteine führt und nur sehr wenig darüber bekannt ist, in welchen Fällen eine deutliche Reduktion der Expression zu beobachten ist und welche Faktoren darauf Einfluss nehmen. Anmerken muss man auch, dass eine Reduktion des UPR-

Systems die Zellen anfälliger für ER-Stress werden lässt und damit zu einem schnelleren Zelltod führt. Interessant ist die Verknüpfung des UPR-Systems mit der Kalziumhomöostase der Zelle, obwohl auch hier die molekularen Grundlagen noch ungeklärt bleiben.

6.1.6 Andere Mausmodelle

In diesem Kapitel werden andere Mausmodelle und ihre Phänotypen vorgestellt und mit denen der DAPAT-defizienten Maus verglichen.

6.1.6.1 Caspr

Der Caspr-Knockout wurde erstmals 2001 von Bhat et al. beschrieben. Zu den Phänotypen dieses Mausmodels gehören:

- Kleinere Statur, weniger Gewicht als vergleichbare Kontrollen
- Bewegungsstörungen (Hypomotilität, Tremor)
- Histologisch normale Bildung des Myelins
- Kein signifikanter Unterschied in Axondurchmesser und Myelinisierung
- Abnormale Paranodien
- Diffusere Verteilung der Natriumkanäle und von Contactin vor allem im Nervus opticus
- Keine Prozessierung der Hochmolekulargewichtsform von Contactin
- Keine Septate-like Junctions
- Neurofascin ist am Knoten selbst angereichert, aber abgereichert im paranodalen Bereich
- Keine räumliche Trennung der Natrium- und Kaliumkanäle
- Verringerte Leitungsgeschwindigkeit
- Axonale Schwellungen mit glattem ER im Cerebellum

6.1.6.2 Contactin

Der Contactin-Knockout wurde 1999 von Berglund et al. generiert. Erwartungsgemäß sind die Phänotypen sehr ähnlich zu dem des Caspr-Knockouts:

- Ataxie
- Weniger Gewicht als vergleichbare Kontrollen
- 18 Tage nach Geburt tödlich
- Missorientierung der Parallelfasern
- Störungen der synaptischen Plastizität der granulären Zellen
- Axonale Schwellungen im Cerebellum

6.1.6.3 CGT- und CST-Knockout

Beide Mausmodelle sind intensiv von mehreren Gruppen untersucht worden. Generiert wurde das CGT-Mausmodell von Bosio et al. (1996) Das CST-Modell wurde von Honke et al. (2002) zum ersten Mal beschrieben. Beide Modelle zeigen erwartungsgemäß gemeinsame Phänotypen:

- Abnormale Paranodien
- Ataxie
- Axonale Schwellungen im Kleinhirn
- Unfruchtbar
- Wachstumsstörungen
- Fehlen der transversen Banden der Septate-like Junctions
- Keine räumliche Trennung der Natrium- und Kaliumkanäle
- Diffusere Verteilung der Ionenkanäle

Unterschiede in den Beschreibungen gibt es allerdings betreffend der Leitungsgeschwindigkeit. Bereits Bosio et al. berichten, dass die Leitungsgeschwindigkeit im peripheren Nervensystem (Nervus ischiaticus) um bis zu 75% reduziert ist. Spätere Messungen von Dupree et al., 1998 bestätigen die Reduktion, finden aber eine geringere, während Honke et al. erwähnen, dass die Leitungsgeschwindigkeit bis zur 18. Lebenswoche nicht signifikant voneinander abweicht.

6.1.6.4 VDCC

Der Knockout der Untereinheit $\alpha 1A$ des spannungsgesteuerten Kalziumkanals wurde von Jun et al. (1999) beschrieben und wurde 2004 von Miyazaki et al. weiter untersucht:

- Ataxie
- Axonale Schwellungen im Kleinhirn
- Kleiner als vergleichbare Kontrollen
- Tödlich vier Wochen nach Geburt
- Hyperspiny
- Purkinjezellsoma-nahe Cluster an VGluT1-positiven Synapsen mit einem Verhältnis von 1:4-6 postsynaptischen Spines zu präsynaptischen Terminals
- Kletterfasersynapsen am Purkinjezellkörper und am proximalen Dendriten; Reduktion des Kletterfaser innervierten Bereichs der Molekularschicht

6.1.6.5 Myosin Va

Die cerebellaren Auswirkungen einer Myosin Va Missense-Mutation wurden von Takagishi et al. (2006) beschrieben:

- Reduzierte Größe des Kleinhirns
- Kletterfasersynapsen am Purkinjezellkörper und am proximalen Dendriten; Reduktion des Kletterfaser innervierten Bereichs der Molekularschicht

- Purkinjezellsoma-nahe Cluster an VGluT1-positiven Synapsen mit einem Verhältnis von 1:4-6 postsynaptischen Spines zu präsynaptischen Terminals

6.1.7 Zusammenfassung

Man muss bei den beschriebenen Modellen zwei Arten von Phänotypen unterscheiden. Einerseits gibt es generelle Defekte wie z.B. das geringere Wachstum oder Ataxie/Bewegungsstörungen und andererseits sehr spezifische Defekte wie das Fehlen der transversen Banden im paranodalen Bereich. Die Gründe für generelle Defekte können unterschiedlich sein. Wachstumsstörungen können auf ein rein koordinatives Defizit bei der Nahrungsaufnahme zurückzuführen sein, z.B. durch einen beeinträchtigten Saugreflex. Bei Lipiddefekten (wie jenen der DHAPAT-, CST- oder CGT-Modelle) ist auch eine Lipidspeicherstörung möglich, was eine Reduktion des Körperfetts zur Folge haben kann. Auch Bewegungsstörungen können vielfältige Ursachen haben. Neben Änderungen in der Leitungsgeschwindigkeit, die die Koordination beeinträchtigen können, sind die bei fast allen Modellen aufgetretenen mittleren bis schweren Schäden im Kleinhirn eine mögliche Ursache für den Phänotyp. Ob nun letztlich die die Schwellungen, die gestörte Innervierung der Purkinjezellen oder die Änderungen im paranodalen Bereich ursächlich sind, muss durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden.

Axonale Schwellungen scheinen generell in fast allen Modellen aufzutreten. Die eigenen Beobachtungen an der DAPAT-defizienten Maus zeigten, dass relativ viele, wenn auch nicht alle, Schwellungen direkt am Ranvierschen Schnürring liegen. Da der Ranviersche Schnürring durch seine besondere Zytoskelettstruktur eine Engstelle im Axon darstellt, besteht die Möglichkeit, dass ein auftretender Transportdefekt gerade dort am ehesten zu einer Stauung transportierten Zellmaterials führt. Ein Defekt in der Kalziumhomöostase könnte zusätzlich zu einer Expansion des glatten ERs in Purkinjezellen führen, die auch zu einer vermehrten Ansammlung von ER-Strukturen in Axonen Anlass gibt. Ein weiterer Ansatzpunkt wäre die Veränderung von Strukturen am Ranvierschen Schnürring, wie z.B. die von LRMs und/oder veränderte Proteinzusammensetzung. Solche Veränderungen könnten die Funktion des Zytoskeletts und so den Transport im Bereich des Ranvierschen Schnürrings beeinträchtigen (siehe **Abb. 5.1**).

Anders als in den Caspr-, Contactin-, CST- oder CGT-Modellen war bei dem hier beschriebenen Modell der EL-Defizienz keine Änderung in der Verteilung und Konzentration der Ionenkanäle zu beobachten. Vor allem die in der CST- und CGT-Maus beschriebene Aufhebung der räumlichen Trennung der Natrium- und Ionenkanäle ist in unserem Modell nie beobachtet worden. Das kann bedeuten, dass in diesen Modellen die Effekte deutlicher ausgeprägt sind oder die Defekte der EL-Defizienz auf einem anderen Mechanismus beruhen. Für diese Argumentation spricht auch die Beobachtung, dass die transversen Banden der Septate-like Junctions nicht generalisiert fehlen und dass der Ranviersche Schnürring auf vielen elektronmikroskopischen Bildern unverändert aussieht.

Die Änderungen in der Purkinjezellinnervation sind dahingegen relativ spezifisch und scheinen direkt mit der Kalziumsignaltransduktion an den Synapsen der Kletterfasern zusammenzuhängen. EL-Defizienz könnte auf verschiedenen Ebenen eingreifen. Auf präsynaptischer Seite kann die Ausschüttung von Neurotransmittern verändert sein (s. Dissertation A. Brodde), auf postsynaptischer Seite können sowohl die Aktivität der Rezeptoren/Ionenkanäle in der Plasmamembran sowie das ER-abhängige Kalziumsignal beeinflusst sein.

Die Interpretation der Daten wird erschwert, da nicht alle Mausmodelle hinsichtlich aller Phänotypen untersucht sind. Caspr- und Contactinknockout wurden bisher nicht auf die Innervierung der Purkinjezellen hin untersucht, während andererseits weder das VDCC- noch das Myosin Va-Modell auf Änderungen des Ranvierschen Schnürrings überprüft wurden.

Ein recht spezifischer Phänotyp scheint die beobachtete Verlängerung des paranodalen Bereichs bei der EL-defizienten Maus zu sein. In der Literatur wird dieser Phänotyp nur noch bei multipler Sklerose (Wolswijk und Balesar, 2003), Caspr-defizienten Mäusen (Rios et al., 2003), MAL-Defizienz (Schaerens-Wiemers et al., 2004) und β IV-Spectrin-Defizienz (Yang et al., 2004) angesprochen. Da bisher nicht bekannt ist, wie die Länge des paranodalen Bereichs festgelegt wird, kann über die Ursachen nur spekuliert werden. Eine einfache Erklärung wäre, dass sich die Länge des paranodalen Bereichs über die Anzahl der Myelinscheiden und damit über die Anzahl der terminalen Loops bestimmt. Dabei wird davon ausgegangen, dass jeder Loop nur über eine bestimmte Länge Kontakte zum Axon aufnimmt. Auf diese Weise würde der Axondurchmesser, der ja die Myelindicke bestimmt (Michailov et al., 2004), auch die Länge des paranodalen Bereichs festlegen. Eine Änderung

der Kontakte zwischen terminalem Loop und Axodlemma könnte so auch Einfluss auf die Länge des paranodalen Bereichs nehmen. Ein anderer Ansatz wäre, dass zytoskeletale Elemente, wie z.B. Spectrine, die paranodale Länge bestimmen und dass Änderungen an der Anbindung des Zytoskeletts an Proteine des paranodalen Bereichs auch die Länge beeinflussen.

6.2 EL und oxidativer Stress

6.2.1 Oxidativer Organstatus

Die Ergebnisse der Messungen zu den Auswirkungen von oxidativem Stress sind unerwartet. Wie in der Einleitung beschrieben deuten mehrere Arbeiten auf eine generelle Schutzfunktion von Etherlipiden/ Plasmalogenen hin. Die meisten Messungen grundlegender Art sind durch in vitro –Experimente an künstlichen Lipidmischungen vorgenommen worden (Sindelar et al., 1999; Maeba et al., 2002; Reiss et al., 1997). Die Vergleichbarkeit mit Messungen direkt an Homogenaten ist also nur eingeschränkt gegeben. Messungen, die direkt in Homogenaten gemacht wurden, deuten aber daraufhin, dass Plasmalogene teilweise empfindlich auf oxidativen Stress reagieren (Stadelmann-Ingrand et al., 2001). Interessanterweise zeigen diese Versuche, dass in den ersten 30 Minuten nach Oxidationsbeginn ein deutlicher initialer Abfall der PL-Konzentration von ca. 30% zu beobachten ist, der sich im weiteren Verlauf nach ca. 6 Stunden verlangsamt. Da in diesen Experimenten keine EL-freien Homogenate zur Verfügung standen, können durch diese Studien keine Aussagen getroffen, inwiefern sich das Fehlen von Etherlipiden auf nicht künstlich erzeugten oxidativen Stress, wie er in vivo vorliegt, auswirkt.

Die hier vorgestellten Messungen, allen voran die TRAP-Messung, lassen darauf schließen, dass Etherlipid-Defizienz keinen generalisierten Effekt auf den oxidativen Status zur Folge hat. Die geringe Reduktion des GSH-Spiegels im ZNS und in der Leber waren nicht signifikant, deuten aber auf nur minimalen oxidativen Stress hin. Warum gerade die Leber in diesem Fall betroffen ist, obwohl sie selbst so gut wie keine Etherlipide enthält, bleibt ungeklärt. Der relativ hohe Plasmalogengehalt im Blut, d.h. vor allem in Erythrozytenmembranen (Wanders et al., 1986), könnte den oxidativen Status der Leber beeinflussen. TBAR-Messungen im Blut zeigten allerdings keine Unterschiede zwischen

Kontrollen und mutanten Tieren. Die beobachtete Erhöhung der GSSG-Werte in der Leber, wie sie nach EL-Defizienz auftritt, wurde vor allem bei Vergiftungen, z.B. durch Schwermetalle (Scibior et al., 2007) aber auch durch Ischämie (Jaeschke, 1990) berichtet.

6.2.2 Lipidperoxidation im zentralen Nervensystem

Da die allgemeinen Indikatoren keine bzw. nur eine leichte Erhöhung des oxidativen Stresses anzeigen, besteht die Möglichkeit, dass Etherlipide bzw. Plasmalogene nur lokal wirksam sind. Ihr Gesamteinfluss auf das antioxidative Potential ist eher gering, aber in ihrer direkten Umgebung also der Plasmamembran schützen sie vor oxidativem Schaden. Die TBARS-Messungen in dieser Arbeit allerdings zeigen, dass Lipidperoxidation von PUFAs im zentralen Nervensystem in Etherlipid-defizienten Tieren stark reduziert ist. Da der Anteil von PUFAs in Etherlipid-defizienten Mäusen nicht wesentlich verändert ist (Rodemer et al., 2003), muss aus diesem Ergebnis geschlossen werden, dass vor allem PUFAs in Etherlipiden anfällig für Oxidation sind. Ob diese Präposition allerdings einen schützenden Effekt für andere Lipide oder Proteine in der Plasmamembran hat, muss angezweifelt werden. Gaschromatographie in Verbindung mit Massenspektrometrie zeigt, dass der Aldehyd, der beim oxidativen Abbau von Etherlipiden aus der sn1-Position freigesetzt wird, mit Ammoniumgruppen aus der direkten Umgebung Schiffsche Basen bildet (Stadelmann-Ingrand et al., 2004). In der Literatur gibt es vermehrt Hinweise dafür, dass derartige Schiffsche Basen schädlich für die Zelle sind (Felde und Spiteller, 1995; Loidl-Stahlhofen et al., 1995; Thukkani et al., 2002). Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass ein Defekt der Fetaldehydhydrogenase das Sjögren-Larsson-Syndrom verursacht und dass vermutet wird, dass vor allem die Akkumulation von Aldehyden die Pathogenese der Krankheit verursachen (Rizzo et al., 2000; Rizzo und Craft; 2000).

Im klaren Gegensatz zu den vorgestellten Ergebnissen zeigen Alzheimer Patienten eine 24%ige signifikante Reduktion des antioxidativen Potentials in einer TRAP-Messung (Repetto et al., 1999).

6.2.3 Lipidperoxidation in Lipidextrakten

Das Ergebnis der TBARS-Messungen aus Lipidextrakten steht konträr zu den Ergebnisse von Sindelar et al. (1999). In dieser Arbeit wurden Etherlipide aus einem Gesamtlipidextrakt mittels saurer Hydrolyse und anschließender chromatographischer Abtrennung der Abbauprodukte entfernt und die Extrakte künstlichem oxidativen Stress ausgesetzt. Nach Herstellung von Lipidextrakten nach Sindelar et al., ohne Notwendigkeit die Etherlipide zu entfernen, führte die Induktion von oxidativem Stress durch Eisenionen und Ascorbat konnten die Beobachtungen von Sindelar et al. nicht reproduziert werden. Es stellt sich also die Frage, ob die zusätzliche Behandlung zur Entfernung der Etherlipide die Ergebnisse nicht beeinflusst. Da Sindelar et al. durch die Aufreinigung der Lipide und den damit verbundenen Verlust von bereits vorhandenem MDA den ursprünglichen Status der Lipidperoxidation nicht bestimmen können, ist ihre Messung auf den Vergleich der Reaktionskinetiken beschränkt. Die hier vorgestellten Messungen zeigen aber, dass im zentralen Nervensystem von vorneherein ein niedrigerer Level an Lipidperoxidation von PUFAs vorliegt. Auch die Kinetiken, die direkt in den Homogenaten gemessen wurden, weisen beim Start also zum Zeitpunkt 0 einen verringerten TBARS-Wert für Etherlipid-defiziente Tiere auf und über den gesamten Verlauf hinweg bleiben die Werte unter denen der Kontrollen.

Wie die Messungen nach Stressinduktion zeigen, liegen die Eisen induzierten Werte etwa zehnmal höher als die natürlich vorliegenden. Daher ist die Frage berechtigt, inwiefern ein solches System Aussagen über eine natürliche antioxidative Funktion von Etherlipiden zulässt. Ansatzweise kann die antioxidative Wirkung von Etherlipiden in solchen Systemen dadurch erklärt werden, dass Etherlipide/Plasmalogene die Möglichkeit besitzen, Metallionen zu binden und dadurch den oxidativen Prozess zu unterbrechen. Diese Überlegungen werden bestärkt durch Arbeiten von Hahnel et al. (1999), die mittels ^1H -Kernspinresonanz zeigen konnten, dass die Oxidation von Lipiden durch Kupferionen durch deren direkte Bindung an Plasmalogene unterbunden wird. Ähnliches wurde in einer früheren Arbeit berichtet (Zommara et al., 1995). Danach reduzieren Plasmalogene zwar die Oxidation von Liposomen durch Kupfer und Eisen, sind aber dazu nur in der Lage, wenn die Oxidation nicht durch ABAP ausgelöst wurde.

6.2.4 Fibroblasten

Die Experimente zur Sensitivität von Fibroblasten gegenüber oxidativem Stress stimmen weitestgehend mit den Ergebnissen von Zoeller et al. (1988) überein. In deren Arbeiten wurde die Empfindlichkeit von CHO-Zellenlinien mit Defekt in der Etherlipidsynthese mittels UV-induziertem oxidativen Stress nachgewiesen. Die Induktion wurde erreicht, indem den Zellen 12-(1'-Pyren)dodecansäure verabreicht wurden, die in Membranlipide der Zellen integrierten. Anschließend wurden die Zellen zur Radikalbildung durch Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht angeregt. Eine Restoration der Etherlipide durch Zugabe von 1-O-Hexadecyl-sn-glycerin konnte diesen Effekt nur teilweise (ca. 50%) wieder umkehren. Die TBARS-Messung von Kontroll- und EL-defizienten Fibroblasten ließ in dieser Arbeit keine Unterschiede unter normalen Zellkulturbedingungen erkennen. Auch muss betrachtet werden, dass in der Arbeit von Zoeller et al. ein Teil des beobachteten Effektes durch eine erhöhte Akkumulation von 12-(1'-Pyren)dodecansäure in den Etherlipid-defizienten CHO-Zellen zustande kam. Letztendlich ist nicht klar, inwiefern sich oxidativer Stress, sei er UV- oder ABAP-induziert, direkt auf die Zelle auswirkt. Klar scheint jedoch zu sein, dass Etherlipid-defiziente Zellen deutlich sensibler auf induzierten Stress reagieren.

Um Ergebnisse aus dem ersten Teil miteinzubeziehen, kann auch spekuliert werden, dass die Abregulation des UPR-Systems, wie sie im Cerebellum beobachtet wurde, auch in Fibroblasten vorliegt. In diesem Falle könnte man argumentieren, dass der Anstieg an ungefalteten Proteinen, verursacht durch oxidativen Stress, nicht mehr ausreichend kompensiert werden kann.

6.3 Ausblick

Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit den Auswirkungen der Etherlipid-Defizienz auf das zentrale Nervensystem. Aus der Diskussion und vor allem durch den Vergleich mit anderen transgenen Tiermodellen kann man aber zwei grundsätzliche Richtungen erkennen. Eine Richtung sind dabei die Proteine des Ranvierschen Schnürrings, allen voran die wichtigen Strukturproteine, wie F3/Contactin, Caspr und Neurofascin 155, die teilweise einen Lipidanker benötigen, spezifisch in LRMs sortieren, und auf diese Weise die richtige Struktur des Myelins gewährleisten. Die andere Richtung deutet auf gestörte Kalziumhomöostase hin,

besonders wenn man die Ähnlichkeit der Phänotypen der DHAPAT-defizienten Maus mit jenen der VDCC- und der Myosin Va-Modelle vergleicht.

Aufzuklären wäre, inwiefern diese beiden Richtungen verknüpft sind. Also zu fragen, ob es sich dabei um einen grundsätzlichen Effekt handelt, der von der Etherlipid-Defizienz hervorgerufen wird oder ob es sich um getrennte molekulare Ursachen handelt. Zu diesem Zweck würde sich auch eine Einbeziehung anderer Tiermodelle anbieten, um zu untersuchen, ob z.B. die Contactin-defiziente Maus dieselben Änderungen in der Purkinjezellinnervierung zeigt wie die EL-defiziente.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Rolle von Etherlipiden als Antioxidantien im intakten Tiermodell untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Rolle der Etherlipide als in vivo wirksame Antioxidantien in Frage gestellt werden muss. Im Zellkulturmodell zeigt sich zwar eine Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress, ob dies aber ursächlich mit dem Fehlen von Etherlipiden zusammenhängt oder eher durch einen sekundären Effekt wie Veränderungen im ER oder Änderung von Proteinaktivitäten bewirkt wird, bleibt zu untersuchen.

7 Verwendete Abkürzungen

- ABAP 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride
- ADHAPS Alkyl-DHAP-Synthase
- APS Ammoniumperoxidsulfat
- BSA bovines Serum-Albumin
- BTH butyliertes Hydroxytoluen
- Caspr Contactin associated protein
- CGT Ceramidgalactosyltransferase
- CHO Chinese hamster ovary
- CST Ceramidsulfotransferase
- ddH₂O doppelt destilliertes Wasser
- DHA Docosahexaensäure
- DHAP Dihydroxyacetonphosphat
- DHAPAT Dihydroxyacetonphosphatacyltransferase
- DMSO Dimethylsulfoxid
- DTNB 5,5'-DithioBis(Nitrobenzoesäure)
- DOC Deoxycholat
- EAA1 early endosomal Antigenau 1
- EDAC 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid hydrochlorid
- EL Etherlipide
- ER endoplasmatisches Retikulum
- FITC Fluorescein Isothiocyanat
- GABA γ -Aminobuttersäure

• GPI	Glycosylphosphatidylinositol
• Grp	Glukose-reguliertes Protein
• GSH	reduziertes Glutathion
• GSSH	oxidiertes Glutathion
• IP3R1	Inositoltriphosphatrezeptor Isotyp 1
• KF	Kletterfaser
• Ko	Knockout
• K _v 1.2	spannungsabhängig Kaliumkanal 1.2
• LRM	lipid raft microdomain
• MBP	Myelin basic protein
• MDA	Malondialdehyd
• mRNS	messenger-Ribonukleinsäure
• PAF	Platelet Activating Factor
• PCR	Polymerasekettenreaktion
• PDI	Proteindisulfidisomerase
• PE-PL	Plasmenylethanolamine
• PF	Parallelfaser
• PFA	Paraformaldehyd
• PL	Plasmalogene
• PLA ₂	Phospholipase A ₂
• PLAP	Placental alkaline phosphatase
• PLP	Proteolipid Protein
• PNS	peripheres Nervensystem
• PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren

- PVDF Polyvinylidenfluorid
- PVP Polyvinylpyrrolidon
- RCFP rhizomele Chondrodysplasia
- ROS reaktive Sauerstoffspezies
- RT Raumtemperatur
- SDS Natriumdodecylsulfat
- SNAP25 Synaptosome-associated protein 25kDa
- SOD Superoxidismutase
- TBARS Thiobarbiturat reaktive Substanzen
- TCA Trichloressigsäure
- TEMED N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
- TRAP Total reactive antioxidant potential
- TRITC Tetramethylrhodamin Isothiocyanat
- ÜN über Nacht
- UPS unfolded protein response
- VDCC spannungsgesteuerte Kalziumkanäle
- VGluT vesikulärer Glutamattransporter
- Wt Wildtyp
- ZNS Zentrales Nervensystem

8 Literaturverzeichnis

Alvarez Otero, R., C. Sotelo, et al. (1993). "Chick/quail chimeras with partial cerebellar grafts: an analysis of the origin and migration of cerebellar cells." J Comp Neurol **333**(4): 597-615.

Arroyo, E. J. and S. S. Scherer (2000). "On the molecular architecture of myelinated fibers." Histochem Cell Biol **113**(1): 1-18.

Banno, T. and K. Kohno (1998). "Conformational changes of the smooth endoplasmic reticulum are facilitated by L-glutamate and its receptors in rat Purkinje cells." J Comp Neurol **402**(2): 252-63.

Beck, A., R. Z. Nieden, et al. (2004). "Calcium release from intracellular stores in rodent astrocytes and neurons in situ." Cell Calcium **35**(1): 47-58.

Becker, B. F. (1993). "Towards the physiological function of uric acid." Free Radic Biol Med **14**(6): 615-31.

Belitz, H.-D. and W. Grosch (1992). "Lehrbuch der Lebensmittelchemie."

Berglund, E. O., K. K. Murai, et al. (1999). "Ataxia and abnormal cerebellar microorganization in mice with ablated contactin gene expression." Neuron **24**(3): 739-50.

Bhat, M. A., J. C. Rios, et al. (2001). "Axon-glia interactions and the domain organization of myelinated axons requires neurexin IV/Caspr/Paranodin." Neuron **30**(2): 369-83.

Boggs, J. M. (2006). "Myelin basic protein: a multifunctional protein." Cell Mol Life Sci **63**(17): 1945-61.

Bollinger, C. R., V. Teichgraber, et al. (2005). "Ceramide-enriched membrane domains." Biochim Biophys Acta **1746**(3): 284-94.

Bonnon, C., L. Goutebroze, et al. (2003). "The paranodal complex of F3/contactin and caspr/paranodin traffics to the cell surface via a non-conventional pathway." J Biol Chem **278**(48): 48339-47.

Bosio, A., E. Binczek, et al. (1996). "Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 13280-5.

Boyle, M. E., E. O. Berglund, et al. (2001). "Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve." Neuron **30**(2): 385-97.

Boyne, A. F. and G. L. Ellman (1972). "A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components." Anal Biochem **46**(2): 639-53.

Brites, P., H. R. Waterham, et al. (2004). "Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease." Biochim Biophys Acta **1636**(2-3): 219-31.

Chance, B., H. Sies, et al. (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." Physiol Rev **59**(3): 527-605.

Condrescu, M., K. Opuni, et al. (2002). "Cellular regulation of sodium-calcium exchange." Ann N Y Acad Sci **976**: 214-23.

Court, F. A., D. L. Sherman, et al. (2004). "Restricted growth of Schwann cells lacking Cajal bands slows conduction in myelinated nerves." Nature **431**(7005): 191-5.

Cunha, D. A., P. Hekerman, et al. (2008). "Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells." J Cell Sci **121**(Pt 14): 2308-18.

Custer, A. W., K. Kazarinova-Noyes, et al. (2003). "The role of the ankyrin-binding protein NrCAM in node of Ranvier formation." J Neurosci **23**(31): 10032-9.

Debuch, H. (1958). "Nature of the linkage of the aldehyde residue of natural plasmalogens." J Neurochem **2**(2-3): 243-8.

Decker, L. and C. ffrench-Constant (2004). "Lipid rafts and integrin activation regulate oligodendrocyte survival." J Neurosci **24**(15): 3816-25.

Denaxa, M., K. Kyriakopoulou, et al. (2005). "The adhesion molecule TAG-1 is required for proper migration of the superficial migratory stream in the medulla but not of cortical interneurons." Dev Biol **288**(1): 87-99.

Denisenko-Nehrbass, N., K. Oguievetskaia, et al. (2003). "Protein 4.1B associates with both Caspr/paranodin and Caspr2 at paranodes and juxtaparanodes of myelinated fibres." Eur J Neurosci **17**(2): 411-6.

Diagne, A., J. Fauvel, et al. (1984). "Studies on ether phospholipids. II. Comparative composition of various tissues from human, rat and guinea pig." Biochim Biophys Acta **793**(2): 221-31.

Donarum, E. A., D. A. Stephan, et al. (2006). "Expression profiling reveals multiple myelin alterations in murine succinate semialdehyde dehydrogenase deficiency." J Inherit Metab Dis **29**(1): 143-56.

Dougherty, R. W., G. R. Dubay, et al. (1989). "Dynamics of the diacylglycerol responses of stimulated phagocytes." J Biol Chem **264**(19): 11263-9.

Dringen, R. and J. Hirrlinger (2003). "Glutathione pathways in the brain." Biol Chem **384**(4): 505-16.

Dulbecco, R. and G. Freeman (1959). "Plaque production by the polyoma virus." Virology **8**(3): 396-7.

Dupree, J. L., T. Coetzee, et al. (1998). "Myelin galactolipids are essential for proper node of Ranvier formation in the CNS." J Neurosci **18**(5): 1642-9.

Einheber, S., M. A. Bhat, et al. (2006). "Disrupted Axo-Glial Junctions Result in Accumulation of Abnormal Mitochondria at Nodes of Ranvier." Neuron Glia Biol **2**(3): 165-174.

Einheber, S., G. Zanazzi, et al. (1997). "The axonal membrane protein Caspr, a homologue of neurexin IV, is a component of the septate-like paranodal junctions that assemble during myelination." J Cell Biol **139**(6): 1495-506.

Faivre-Sarrailh, C., F. Gauthier, et al. (2000). "The glycosylphosphatidyl inositol-anchored adhesion molecule F3/contactin is required for surface transport of paranodin/contactin-associated protein (caspr)." J Cell Biol **149**(2): 491-502.

Falk, J., O. Thoumine, et al. (2004). "NrCAM coupling to the cytoskeleton depends on multiple protein domains and partitioning into lipid rafts." Mol Biol Cell **15**(10): 4695-709.

Farooqui, A. A. and L. A. Horrocks (2001). "Plasmalogens: workhorse lipids of membranes in normal and injured neurons and glia." Neuroscientist **7**(3): 232-45.

Farooqui, A. A., H. C. Yang, et al. (1997). "Phospholipase A2 and its role in brain tissue." J Neurochem **69**(3): 889-901.

Fauconneau, B., S. Stadelmann-Ingrand, et al. (2001). "Evidence against a major role of plasmalogens in the resistance of astrocytes in lactic acid-induced oxidative stress in vitro." Arch Toxicol **74**(11): 695-701.

Faust, P. L., H. M. Su, et al. (2001). "The peroxisome deficient PEX2 Zellweger mouse: pathologic and biochemical correlates of lipid dysfunction." J Mol Neurosci **16**(2-3): 289-97; discussion 317-21.

Felde, R. and G. Spiteller (1995). "Plasmalogen oxidation in human serum lipoproteins." Chem Phys Lipids **76**(2): 259-67.

Feulgen, R. and K. Voit (1924). "Aldehyde of wide distribution; its origin, its microchemical, and microscopical detection." Pflügers Arch. Ges. Physiol **260**: 389-391.

Ford, D. A., R. Miyake, et al. (1989). "Activation of protein kinase C by naturally occurring ether-linked diglycerides." J Biol Chem **264**(23): 13818-24.

Garcia-Fresco, G. P., A. D. Sousa, et al. (2006). "Disruption of axo-glial junctions causes cytoskeletal disorganization and degeneration of Purkinje neuron axons." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(13): 5137-42.

Ge, Y., S. Dudoit, et al. (2003). "Resampling-based multiple testing for microarray data analysis."

Genova, M. L., M. M. Pich, et al. (2003). "Mitochondrial production of oxygen radical species and the role of Coenzyme Q as an antioxidant." Exp Biol Med (Maywood) **228**(5): 506-13.

Ginsberg, L., S. Rafique, et al. (1995). "Disease and anatomic specificity of ethanolamine plasmalogen deficiency in Alzheimer's disease brain." Brain Res **698**(1-2): 223-6.

Glaser, P. E. and R. W. Gross (1994). "Plasmenylethanolamine facilitates rapid membrane fusion: a stopped-flow kinetic investigation correlating the propensity of a major plasma membrane constituent to adopt an HII phase with its ability to promote membrane fusion." Biochemistry **33**(19): 5805-12.

Gremo, F., G. E. De Medio, et al. (1985). "Mature and immature synaptosomal membranes have a different lipid composition." Neurochem Res **10**(1): 133-44.

Gressens, P. (2006). "Pathogenesis of migration disorders." Curr Opin Neurol **19**(2): 135-40.

Hahnel, D., T. Huber, et al. (1999). "Contribution of copper binding to the inhibition of lipid oxidation by plasmalogen phospholipids." Biochem J **340** (Pt 2): 377-83.

Hajra, A. K. (1995). "Glycerolipid biosynthesis in peroxisomes (microbodies)." Prog Lipid Res **34**(4): 343-64.

Hale, C. C., E. G. Ebeling, et al. (1998). "The selective activation of the cardiac sarcolemmal sodium-calcium exchanger by plasmalogenic phosphatidic acid produced by phospholipase D." FEBS Lett **422**(2): 247-51.

Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1999). "Free Radicals in Biology and Medicine."

Han, X. (2005). "Lipid alterations in the earliest clinically recognizable stage of Alzheimer's disease: implication of the role of lipids in the pathogenesis of Alzheimer's disease." Curr Alzheimer Res **2**(1): 65-77.

He, J., H. Kang, et al. (2004). "The endoplasmic reticulum-related events in S-nitrosoglutathione-induced neurotoxicity in cerebellar granule cells." Brain Res **1015**(1-2): 25-33.

Hirase, H., L. Qian, et al. (2004). "Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo." PLoS Biol **2**(4): E96.

Hoefler, G., E. Paschke, et al. (1991). "Photosensitized killing of cultured fibroblasts from patients with peroxisomal disorders due to pyrene fatty acid-mediated ultraviolet damage." J Clin Invest **88**(6): 1873-9.

Honke, K., Y. Hirahara, et al. (2002). "Paranodal junction formation and spermatogenesis require sulfoglycolipids." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4227-32.

Honke, K., Y. Zhang, et al. (2004). "Biological roles of sulfoglycolipids and pathophysiology of their deficiency." Glycoconj J **21**(1-2): 59-62.

Hoshi, T., A. Suzuki, et al. (2007). "Nodal protrusions, increased Schmidt-Lanterman incisures, and paranodal disorganization are characteristic features of sulfatide-deficient peripheral nerves." Glia **55**(6): 584-94.

Huang, G., J. Yao, et al. (2006). "ER stress disrupts Ca²⁺-signaling complexes and Ca²⁺ regulation in secretory and muscle cells from PERK-knockout mice." J Cell Sci **119**(Pt 1): 153-61.

Ichikawa, R., T. Miyazaki, et al. (2002). "Distal extension of climbing fiber territory and multiple innervation caused by aberrant wiring to adjacent spiny branchlets in cerebellar Purkinje cells lacking glutamate receptor delta 2." J Neurosci **22**(19): 8487-503.

Ikezawa, H. (2002). "Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins." Biol Pharm Bull **25**(4): 409-17.

Ishibashi, T., J. L. Dupree, et al. (2002). "A myelin galactolipid, sulfatide, is essential for maintenance of ion channels on myelinated axon but not essential for initial cluster formation." J Neurosci **22**(15): 6507-14.

Jaeschke, H. (1990). "Glutathione disulfide as index of oxidant stress in rat liver during hypoxia." Am J Physiol **258**(4 Pt 1): G499-505.

Jin, L. T., S. Y. Hwang, et al. (2004). "Sensitive silver staining of protein in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using an azo dye, calconcarboxylic acid, as a silver-ion sensitizer." Electrophoresis **25**(15): 2494-500.

Jones, D. P. (2006). "Redefining oxidative stress." Antioxid Redox Signal **8**(9-10): 1865-79.

Jun, K., E. S. Piedras-Renteria, et al. (1999). "Ablation of P/Q-type Ca(2+) channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the alpha(1A)-subunit." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 15245-50.

Karar, J., K. S. Dolt, et al. (2008). "Endoplasmic reticulum stress response in murine kidney exposed to acute hypobaric hypoxia." FEBS Lett **582**(17): 2521-6.

Katoh, A., J. A. Jindal, et al. (2007). "Motor deficits in homozygous and heterozygous p/q-type calcium channel mutants." J Neurophysiol **97**(2): 1280-7.

Kelly, K. A., C. M. Havrilla, et al. (1998). "Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems." Environ Health Perspect **106**(7): 375-84.

Kojo, S. (2004). "Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress." Curr Med Chem **11**(8): 1041-64.

Komuro, H. and E. Yacubova (2003). "Recent advances in cerebellar granule cell migration." Cell Mol Life Sci **60**(6): 1084-98.

Kramer, E. M., C. Klein, et al. (1999). "Compartmentation of Fyn kinase with glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules in oligodendrocytes facilitates kinase activation during myelination." J Biol Chem **274**(41): 29042-9.

Kramer, E. M., T. Koch, et al. (1997). "Oligodendrocytes direct glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins to the myelin sheath in glycosphingolipid-rich complexes." J Biol Chem **272**(14): 8937-45.

Krapfenbauer, K., M. Berger, et al. (2001). "Changes in the brain protein levels following administration of kainic acid." Electrophoresis **22**(10): 2086-91.

Langford, G. M. (2002). "Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport." Traffic **3**(12): 859-65.

Lappe-Siefke, C., S. Goebbels, et al. (2003). "Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination." Nat Genet **33**(3): 366-74.

Larocca, J. N. and A. G. Rodriguez-Gabin (2002). "Myelin biogenesis: vesicle transport in oligodendrocytes." Neurochem Res **27**(11): 1313-29.

Lee, T. C. (1998). "Biosynthesis and possible biological functions of plasmalogens." Biochim Biophys Acta **1394**(2-3): 129-45.

Lewis Carl, S. A., I. Gillete-Ferguson, et al. (1993). "An indirect immunofluorescence procedure for staining the same cryosection with two mouse monoclonal primary antibodies." J Histochem Cytochem **41**(8): 1273-8.

Lohner, K. (1996). "Is the high propensity of ethanolamine plasmalogens to form non-lamellar lipid structures manifested in the properties of biomembranes?" Chem Phys Lipids **81**(2): 167-84.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.

Lu, A., M. Hiltunen, et al. (2008). "Effects of Ubiquilin 1 on the Unfolded Protein Response." J Mol Neurosci.

Maeba, R., Y. Sawada, et al. (2002). "Ethanolamine plasmalogens protect cholesterol-rich liposomal membranes from oxidation caused by free radicals." Chem Phys Lipids **120**(1-2): 145-51.

Maier, O., W. Baron, et al. (2007). "Reduced raft-association of NF155 in active MS-lesions is accompanied by the disruption of the paranodal junction." Glia **55**(8): 885-95.

Marcus, J., S. Honigbaum, et al. (2006). "Sulfatide is essential for the maintenance of CNS myelin and axon structure." Glia **53**(4): 372-81.

Marinetti, G. V., J. Erbland, et al. (1959). "The structure of beef heart plasmalogens." J Am Chem Soc **81**: 861.

Marnett, L. J. (1999). "Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde." Mutat Res **424**(1-2): 83-95.

Martinez, M. (1992). "Abnormal profiles of polyunsaturated fatty acids in the brain, liver, kidney and retina of patients with peroxisomal disorders." Brain Res **583**(1-2): 171-82.

McCord, J. M. and I. Fridovich (1969). "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)." J Biol Chem **244**(22): 6049-55.

Meyer, S., E. Orso, et al. (2007). "Lubrol-RAFTs in melanoma cells: a molecular platform for tumor-promoting ephrin-B2-integrin-beta1 interaction." J Invest Dermatol **127**(7): 1615-21.

Michailov, G. V., M. W. Sereda, et al. (2004). "Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness." Science **304**(5671): 700-3.

Miyazaki, T., K. Hashimoto, et al. (2004). "P/Q-type Ca^{2+} channel $\alpha 1\text{A}$ regulates synaptic competition on developing cerebellar Purkinje cells." J Neurosci **24**(7): 1734-43.

Nagan, N. and R. A. Zoeller (2001). "Plasmalogens: biosynthesis and functions." Prog Lipid Res **40**(3): 199-229.

Nguyen, D. H. and D. Taub (2002). "CXCR4 function requires membrane cholesterol: implications for HIV infection." J Immunol **168**(8): 4121-6.

Oakley, B. R., D. R. Kirsch, et al. (1980). "A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels." Anal Biochem **105**(2): 361-3.

Ogawa, Y., D. P. Schafer, et al. (2006). "Spectrins and ankyrinB constitute a specialized paranodal cytoskeleton." J Neurosci **26**(19): 5230-9.

Paltauf, F. (1994). "Ether lipids in biomembranes." Chem Phys Lipids **74**(2): 101-39.

Parsons, J. T., S. B. Churn, et al. (1997). "Ischemia-induced inhibition of calcium uptake into rat brain microsomes mediated by $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ ATPase." J Neurochem **68**(3): 1124-34.

Paschen, W. (2003). "Endoplasmic reticulum: a primary target in various acute disorders and degenerative diseases of the brain." Cell Calcium **34**(4-5): 365-83.

Pillai, A. M., G. P. Garcia-Fresco, et al. (2007). "No effect of genetic deletion of contactin-associated protein (CASPR) on axonal orientation and synaptic plasticity." J Neurosci Res **85**(11): 2318-31.

Poliak, S. and E. Peles (2003). "The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier." Nat Rev Neurosci **4**(12): 968-80.

Portilla, D. and G. Dai (1996). "Purification of a novel calcium-independent phospholipase A2 from rabbit kidney." J Biol Chem **271**(26): 15451-7.

Rapport, M. M., B. Lerner, et al. (1957). "The structure of plasmalogens. II. Crystalline lysophosphatidal ethanolamine (acetal phospholipide)." J Biol Chem **225**(2): 859-67.

Reiss, D., K. Beyer, et al. (1997). "Delayed oxidative degradation of polyunsaturated diacyl phospholipids in the presence of plasmalogen phospholipids in vitro." Biochem J **323** (Pt 3): 807-14.

Repetto, M. G., C. G. Reides, et al. (1999). "Peripheral markers of oxidative stress in probable Alzheimer patients." Eur J Clin Invest **29**(7): 643-9.

Rios, J. C., M. Rubin, et al. (2003). "Paranodal interactions regulate expression of sodium channel subtypes and provide a diffusion barrier for the node of Ranvier." J Neurosci **23**(18): 7001-11.

Rizzo, W. B. and D. A. Craft (2000). "Sjogren-Larsson syndrome: accumulation of free fatty alcohols in cultured fibroblasts and plasma." J Lipid Res **41**(7): 1077-81.

Rizzo, W. B., E. Heinz, et al. (2000). "Microsomal fatty aldehyde dehydrogenase catalyzes the oxidation of aliphatic aldehyde derived from ether glycerolipid catabolism: implications for Sjogren-Larsson syndrome." Biochim Biophys Acta **1535**(1): 1-9.

Rodemer, C., T. P. Thai, et al. (2003). "Targeted disruption of ether lipid synthesis in mice." Adv Exp Med Biol **544**: 355-68.

Rodemer, C., T. P. Thai, et al. (2003). "Inactivation of ether lipid biosynthesis causes male infertility, defects in eye development and optic nerve hypoplasia in mice." Hum Mol Genet **12**(15): 1881-95.

Ron, D. and S. R. Hubbard (2008). "How IRE1 reacts to ER stress." Cell **132**(1): 24-6.

Ruiz i Altaba, A., V. Palma, et al. (2002). "Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain." Nat Rev Neurosci **3**(1): 24-33.

Saher, G., B. Brugger, et al. (2005). "High cholesterol level is essential for myelin membrane growth." Nat Neurosci **8**(4): 468-75.

Sakurai, T., M. Lustig, et al. (2001). "Overlapping functions of the cell adhesion molecules Nr-CAM and L1 in cerebellar granule cell development." J Cell Biol **154**(6): 1259-73.

Sangrey, T. D., W. O. Friesen, et al. (2004). "Analysis of the optimal channel density of the squid giant axon using a reparameterized Hodgkin-Huxley model." J Neurophysiol **91**(6): 2541-50.

Schaeren-Wiemers, N., A. Bonnet, et al. (2004). "The raft-associated protein MAL is required for maintenance of proper axon--glia interactions in the central nervous system." J Cell Biol **166**(5): 731-42.

Schafer, D. P., R. Bansal, et al. (2004). "Does paranode formation and maintenance require partitioning of neurofascin 155 into lipid rafts?" J Neurosci **24**(13): 3176-85.

Scharfenberger, M., J. Ortiz, et al. (2003). "Nsl1p is essential for the establishment of bipolarity and the localization of the Dam-Duo complex." Embo J **22**(24): 6584-97.

Schwab, M. E. (1996). "Molecules inhibiting neurite growth: a minireview." Neurochem Res **21**(7): 755-61.

Scibior, A. and H. Zaporowska (2007). "Effects of vanadium(V) and/or chromium(III) on L-ascorbic acid and glutathione as well as iron, zinc, and copper levels in rat liver and kidney." J Toxicol Environ Health A **70**(8): 696-704.

Sherman, D. L. and P. J. Brophy (2005). "Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth." Nat Rev Neurosci **6**(9): 683-90.

Sillitoe, R. V. and A. L. Joyner (2007). "Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum." Annu Rev Cell Dev Biol **23**: 549-77.

Sindelar, P. J., Z. Guan, et al. (1999). "The protective role of plasmalogens in iron-induced lipid peroxidation." Free Radic Biol Med **26**(3-4): 318-24.

Singh, N., R. A. Zoeller, et al. (1994). "Addition of lipid substituents of mammalian protein glycosylphosphoinositol anchors." Mol Cell Biol **14**(1): 21-31.

Sotelo, C. (1990). "Axonal abnormalities in cerebellar Purkinje cells of the 'hyperspiny Purkinje cell' mutant mouse." J Neurocytol **19**(5): 737-55.

Stadelmann-Ingrand, S., S. Favreliere, et al. (2001). "Plasmalogen degradation by oxidative stress: production and disappearance of specific fatty aldehydes and fatty alpha-hydroxyaldehydes." Free Radic Biol Med **31**(10): 1263-71.

Stadelmann-Ingrand, S., R. Pontcharraud, et al. (2004). "Evidence for the reactivity of fatty aldehydes released from oxidized plasmalogens with phosphatidylethanolamine to form Schiff base adducts in rat brain homogenates." Chem Phys Lipids **131**(1): 93-105.

Steffensen, I., S. G. Waxman, et al. (1997). "Immunolocalization of the Na(+)-Ca²⁺ exchanger in mammalian myelinated axons." Brain Res **776**(1-2): 1-9.

Strahlendorf, J. C., T. Brandon, et al. (1998). "AMPA receptor-mediated alterations of intracellular calcium homeostasis in rat cerebellar Purkinje cells in vitro: correlates to dark cell degeneration." Neurochem Res **23**(11): 1355-62.

Sudarov, A. and A. L. Joyner (2007). "Cerebellum morphogenesis: the foliation pattern is orchestrated by multi-cellular anchoring centers." Neural Develop **2**: 26.

Sugihara, I. (2006). "Organization and remodeling of the olivocerebellar climbing fiber projection." Cerebellum **5**(1): 15-22.

Susuki, K., H. Baba, et al. (2007). "Gangliosides contribute to stability of paranodal junctions and ion channel clusters in myelinated nerve fibers." Glia **55**(7): 746-57.

Suzuki, S., T. Numakawa, et al. (2004). "BDNF-induced recruitment of TrkB receptor into neuronal lipid rafts: roles in synaptic modulation." J Cell Biol **167**(6): 1205-15.

Takagishi, Y., K. Hashimoto, et al. (2007). "Diminished climbing fiber innervation of Purkinje cells in the cerebellum of myosin Va mutant mice and rats." Dev Neurobiol **67**(7): 909-23.

Tazi, K. A., I. Bieche, et al. (2007). "In vivo altered unfolded protein response and apoptosis in livers from lipopolysaccharide-challenged cirrhotic rats." J Hepatol **46**(6): 1075-88.

ten Donkelaar, H. J., M. Lammens, et al. (2003). "Development and developmental disorders of the human cerebellum." J Neurol **250**(9): 1025-36.

Thukkani, A. K., F. F. Hsu, et al. (2002). "Reactive chlorinating species produced during neutrophil activation target tissue plasmalogens: production of the chemoattractant, 2-chlorohexadecanal." J Biol Chem **277**(6): 3842-9.

Toroser, D. and R. S. Sohal (2007). "Age-associated perturbations in glutathione synthesis in mouse liver." Biochem J **405**(3): 583-9.

Van den Bosch, H., G. Schrakamp, et al. (1993). "Ether lipid synthesis and its deficiency in peroxisomal disorders." Biochimie **75**(3-4): 183-9.

Wanders, R. J., Y. R. Purvis, et al. (1986). "Age-related differences in plasmalogen content of erythrocytes from patients with the cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome: implications for postnatal detection of the disease." J Inherit Metab Dis **9**(4): 335-42.

Warner, D. S., H. Sheng, et al. (2004). "Oxidants, antioxidants and the ischemic brain." J Exp Biol **207**(Pt 18): 3221-31.

Watanabe, M. (2008). "Molecular mechanisms governing competitive synaptic wiring in cerebellar Purkinje cells." Tohoku J Exp Med **214**(3): 175-90.

Wolf, R. A. and R. W. Gross (1985). "Identification of neutral active phospholipase C which hydrolyzes choline glycerophospholipids and plasmalogen selective phospholipase A2 in canine myocardium." J Biol Chem **260**(12): 7295-303.

Wolswijk, G. and R. Balesar (2003). "Changes in the expression and localization of the paranodal protein Caspr on axons in chronic multiple sclerosis." Brain **126**(Pt 7): 1638-49.

Yacubova, E. and H. Komuro (2003). "Cellular and molecular mechanisms of cerebellar granule cell migration." Cell Biochem Biophys **37**(3): 213-34.

Yagi, T., N. E. Simpson, et al. (1977). "The relationship of conduction velocity to other physiological properties of the cat's horizontal canal neurons." Exp Brain Res **30**(4): 587-600.

Yang, H. C., A. A. Farooqui, et al. (1996). "Characterization of plasmalogen-selective phospholipase A2 from bovine brain." Adv Exp Med Biol **416**: 309-13.

Yang, X. L., W. C. Xiong, et al. (2004). "Lipid rafts in neuregulin signaling at synapses." Life Sci **75**(21): 2495-504.

Yang, Y., S. Lacas-Gervais, et al. (2004). "BetaIV spectrins are essential for membrane stability and the molecular organization of nodes of Ranvier." J Neurosci **24**(33): 7230-40.

Yoo, B. Y., L. Orelund, et al. (1974). "Letter: Effects of formaldehyde and glutaraldehyde fixation on the monoamine oxidase activity in isolated rat liver mitochondria." J Histochem Cytochem **22**(6): 445-6.

Yuste, R. and T. Bonhoeffer (2004). "Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies." Nat Rev Neurosci **5**(1): 24-34.

Zoeller, R. A., A. C. Lake, et al. (1999). "Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether." Biochem J **338** (Pt 3): 769-76.

Zoeller, R. A., O. H. Morand, et al. (1988). "A possible role for plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing." J Biol Chem **263**(23): 11590-6.

Zommara, M., N. Tachibana, et al. (1995). "Inhibitory effect of ethanolamine plasmalogen on iron- and copper-dependent lipid peroxidation." Free Radic Biol Med **18**(3): 599-602.